

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Nevena J. Jovičić

POLIMORFIZMI U GENU ZA BETA-2
ADRENERGIČKI RECEPTOR KOD DECE SA
ASTMOM U SRBIJI I NJIHOV KLINIČKI ZNAČAJ

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Nevena J. Jovičić

ADRB2 GENE POLYMORPHISMS AND
SALBUTAMOL RESPONSIVENESS IN SERBIAN
CHILDREN WITH ASTHMA

Doctoral Thesis

Belgrade, 2018.

PODACI O MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor: Prof. dr Branimir Nestorović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Univerzitetska dečja klinika Beograd

Komentor: Dr sc. Aleksandra Nikolić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Članovi komisije:

Prof. dr Branislava Milenković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Klinika za pulmologiju, Klinički centar Srbije

Prof. dr Dušica Simić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Univerzitetska dečja klinika Beograd

Dr sc. Dragica Radojković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane:

Zahvaljujem se,

Prijateljima i dobrim ljudima koji su bili uz mene na putu do cilja.

Posvećeno,

Mojoj porodici...s ljubavlju onima koji su živi, i uspomeni na one koji više nisu.

SAŽETAK

Uvod: agonisti beta-2 adrenergičnog receptora (ADRB2) su osnova terapije astme. Beta-2 adrenergični receptor je protein koji je kodiran ADRB2 genom i varijante unutar ovog gena mogu imati kao posledicu značajne modulacije terapijskog odgovora na primenjen lek.

Metode: studija preseka je sprovedena u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu u periodu od oktobra 2016. do maja 2017. godine. U istraživanje je uključeno 54 dece sa astmom uzrasta od 6 do 18 godina. Dijagnoza astme je postavljena u skladu sa GINA smernicama. Ispitanici su u skladu sa GINA smernicama klasifikovani prema težini bolesti u tri podgrupe: ispitanici sa blagom, umerenom i oni sa teškom astmom. Kod svih ispitanika je urađena genotipizacija za polimorfizme ADRB2 +46A>G (Arg16Gln, rs1042713) i +79C>G (Gln27Glu, rs1042714). Ispitana je povezanost ovih polimorfizama sa težinom astme, kao i sa bronhodilatatornim odgovorom na inhalirani salbutamol.

Rezultati: u ispitivanoj populaciji dece iz Srbije sa astmom, alel +46A je detektovan sa učestalošću od 41,7%, a alel +79G je otkriven sa učestalošću od 23,1%. Ispitivanjem je utvrđeno da je alel +46G povezan sa boljim terapijskim odgovorom na inhalirani salbutamol ($p < 0,05$). Ovaj alel je povezan i sa blagim oblikom astme ($p < 0,05$).

Zaključak: polimorfizam ADRB2 +46A>G može biti determinanta težine astme, kao i bronhodilatatornog odgovora na salbutamol kod dece sa astmom u Srbiji. Nismo pronašli povezanost polimorfizma +79C>G sa težinom astme i bronhodilatatornim odgovorom na inhalirani salbutamol.

Rezultati ove studije mogu biti potencijalno korisni za personalizovani pristup lečenju astme.

Ključne reči: ADRB2 gen, astma, beta-2 agonist, bronhodilatatorni odgovor, polimorfizam

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: pulmologija

ABSTRACT

Background: Inhaled beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) agonists are mainstay of asthma therapy. The ADRB2 protein is encoded by the ADRB2 gene and variants within this gene can have significant consequences for modulating the response to asthma therapy.

Methods: This cross-sectional study was conducted at the University Children's Hospital in Belgrade between October 2016 and May 2017. 54 children with asthma aged 6 to 18 years are included in the study. The diagnosis of asthma is set in accordance with GINA guidelines. Subjects are in accordance with GINA guidelines classified according to the severity of the disease in three subgroups: subjects with mild, moderate and those with severe asthma. In all subjects, genotyping for polymorphisms ADRB2 + 46A>G (Arg16Gln, rs1042713) and + 79C>G (Gln27Glu, rs1042714) was studied. The association of these polymorphisms with the severity of asthma and bronchodilator response to inhaled salbutamol was studied.

Results: In the study population of Serbian asthmatic children, allele + 46A was detected with a frequency of 41.7%, and allele + 79G was detected with a frequency of 23.1%. The study found that allele + 46G was associated with a better response to inhaled salbutamol ($p < 0.05$). This allele is also associated with mild asthma ($p < 0.05$).

Conclusions: Polymorphism of ADRB2 + 46G> A can be a determinant of asthma severity and the bronchodilator response to salbutamol in children with asthma in Serbia. We did not find the correlation of polymorphism + 79C> G with the severity of asthma and the bronchodilator response to inhaled salbutamol. The results of this study may be potentially useful for a personalized approach to the treatment of asthma.

Key words: ADRB2 gene, Asthma, beta-2 agonist, bronchodilator response, polymorphism

Scientific area: Medicine

Narrow scientific field: Pulmonology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Astma kod dece	1
1.1.1. Učestalost astme	1
1.1.2. Definicija astme	2
1.1.3. Etiologija astme	2
1.1.3.1. Genetska predispozicija	2
1.1.3.2. Bronhijalna hiperreaktivnost	3
1.1.3.3. Pol	3
1.1.3.4. Atopija i alergeni	4
1.1.3.5. Infekcije respiratornog trakta	4
1.1.3.6. Gojaznost	5
1.1.3.7. Izlaganje duvanskom dimu	6
1.1.3.8. Perinatalni faktori	6
1.1.3.9. Zagađenost vazduha	7
1.1.4. Patofiziologija astme	8
1.1.4.1. Zapaljenje disajnih puteva	8
1.1.4.2. Remodelovanje bronha	9
1.1.5. Dijagnoza astme	9
1.1.5.1. Diferencijalna dijagnoza astme	11
1.1.6. Fenotipovi i endotipovi astme	11
1.1.7. Podela astme	13
1.1.7.1. Podela astme prema težini bolesti	13

1.1.7.2. Podela astme prema stepenu kontrole	14
1.1.7.2.1. Dijagnostičke metode za praćenje aktivnosti astme	15
1.1.7.2.1.1. Spirometrija	15
1.1.7.2.1.2. Ukupni IgE	15
1.1.7.2.1.3. Testovi za ocenu subjektivnog doživljaja simptoma astme: ACT/AQLQ testovi	16
1.1.8. Egzacerbacija astme	16
1.1.9. Lečenje astme	16
1.1.9.1. Farmakoterapija astme kod dece	17
1.1.10. Beta 2 agonisti	19
1.1.10.1 Kratkodelujući beta-2 agonisti	19
1.1.10.1.1. Salbutamol	19
1.1.11.2. Beta-2 adrenergički receptor	21
1.1.11.3. Normalna regulacija receptora	22
1.1.11.4. Interakcija beta-2 receptora/agonista	26
1.1.11.5. Desenzibilizacija beta-2 receptora	26
1.1.11.6. Polimorfizmi u ADRB2 genu	27
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3. MATERIJAL I METODE	32
3.1. Ispitanici	32
3.1.1. Kriterijumi za isključenje	33
3.2. Metode ispitivanja	33
3.2.1. Anamneza i klinički pregled	33

3.2.2. Laboratorijska ispitivanja	34
3.2.3. Spirometrija	35
3.2.4. Genotipizacija ADRB2 +46A>G (Arg16Gly) i +79C> G (Gln27Glu) polimorfizama	36
3.3. Statistička analiza	36
4. REZULTATI	38
4.1. Karakteristike ispitivane populacije i distribucija učestalosti ispitivanih polimorfizama	38
4.2. Uticaj ispitivanih polimorfizama na težinu astme	45
4.3. Uticaj ispitivanih polimorfizama na bronhodilatatorni odgovor	46
5. DISKUSIJA	50
6. ZAKLJUČCI	59
7. LITERATURA	61

1. UVOD

1.1. Astma kod dece

1.1.1. Učestalost astme

Astma je hronična bolest disajnih puteva. Oko 300 miliona ljudi širom sveta boluje od astme (1–18% populacije u različitim zemljama) i očekuje se povećanje bolesti do 400 miliona širom sveta do 2025. godine (1). Astma je najčešća hronična bolest kod dece u skoro svim industrijskim zemljama u svetu (2). Postoje zapanjujuće globalne varijacije u prevalenciji simptoma astme kod dece, čak i do 13 puta različita vrednost između pojedinih zemalja (3). Najopsežnija epidemiološka studija o prevalenciji atopijskih bolesti i astme kod dece je studija ISAAC (eng. *International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) (4). U prvu fazu studije bilo je uključeno 56 zemalja i 156 centara širom sveta sa uključenih 304 796 dece uzrasta od 6 do 7 godina i 463 801 dece uzrasta od 13 do 14 godina. Prema rezultatima ove studije, prevalencija šištanja u poslednjih 12 meseci u grupi dece uzrasta od 13 do 14 godina je u rasponu od 2,1% do 32,2% u različitim populacijama, s najnižom prevalencijom u Indoneziji, Albaniji, Rumuniji i Grčkoj, a najvišom u Velikoj Britaniji, Novom Zelandu i Australiji. Prema domaćim autorima učestalost astme u našoj zemlji je 6% (5).

Dramatični porast incidencije i prevalencije astme u nekoliko poslednjih decenija postaje globalni problem (6). U vezi s tim, pojedini autori su izneli zanimljiva zapažanja:

1. Prevalencija astme je u porastu širom sveta;
2. Astma je uglavnom češća u Zapadnim zemljama nego u zemljama u razvoju;
3. Astma je češća u zemljama engleskog govornog područja;
4. Prevalencija astme je u porastu u zemljama u razvoju kako se one „vesterniziraju“ ili urbanizuju;
5. Prevalencija drugih alergijskih bolesti je takođe, u porastu (7).

1.1.2. Definicija astme

Astma je jedna od najčešćih hroničnih inflamatornih respiratornih bolesti kod dece, sa još uvek potpuno nerazjašnjenom patogenezom. Zbog toga je najveći deo njene definicije baziran na funkcionalnim posledicama inflamacije disajnih puteva i uključuje tri najbitnije karakteristike: hroničnu inflamaciju, hiperreaktivnost disajnih puteva na različite stimulse i reverzibilnu bronhoopstrukciju.

Aktuelna definicija astme glasi (GINA 2016):

„Astma je heterogena bolest, koja se karakteriše hroničnim zapaljenjem disajnih puteva. Definisana je istorijom respiratornih simptoma kao što su šištanje , kratkoća daha, steznja u grudima i kašalj sa različitim intenzitetom i dužinom trajanja, zajedno sa ograničenim protokom vazduha u ekspirijumu“ (8).

1.1.3. Etiologija astme

Astma je multifaktorski uzrokovana bolest čija su učestalost i klinička slika rezultat udruženog delovanja različitih genetskih faktora i faktora sredine. Najpoznatiji faktori rizika za astmu su genetska predispozicija, pol, bronhijalna hiperreaktivnost, atopija, izlaganje alergenima, infekcijama, duvanskom dimu, gojaznost i perinatalni faktori (7,8).

1.1.3.1. Genetska predispozicija

Na postojanje sklonosti ka nasleđivanju astme nedvosmisleno ukazuju rezultati istraživanja koja su sprovedena na blizancima i porodicama pacijenata sa astmom (9–11). Nasleđivanje u astmi nije praćeno klasičnim Mendelovim modelom nasleđivanja koje karakteriše monogenske bolesti, što ukazuje na to da je astma zapravo multigenetska bolest. Razni geni kod različitih pojedinaca dovode do istog fenotipa astme (lokusna heterogenost), dok je kombinovano delovanje višestrukih gena kod istog pojedinca neophodno za manifestaciju određenog fenotipa astme (oligensko ili poligensko nasleđe) (12).

Posmatrajući astmu kao sindrom, a ne samo jednu bolest, genetička istraživanja bila su fokusirana na nekoliko osnovnih osobina astme: atopija, bronhijalna hiperreaktivnost, stvaranje inflamatornih medijatora, kao što su: citokini, hemokini i faktori rasta i ravnoteža Th 1 (pomoćnički T limfociti 1, eng. *T-helper 1*) i Th 2 (pomoćnički T limfociti 2, eng. *T-helper 2*) imunološkog odgovora (13).

Iako je utvrđena povezanost između povećane serumske koncentracije ukupnog imunoglobulina E (IgE) i bronhijalne hiperreaktivnosti sa hromozomom 5q 31 (14), receptora visokog stepena afiniteta za IgE (FceRI) i hromozoma 11q13 (15), bronhijalne hiperreaktivnost i atopije sa genom za TNF- α (faktor nekroze tumora α), zatim povezanost gena ADAM33 koji se nalazi na hromozomu 20p sa remodelovanjem bronha (16), genetska predispozicija za pojavu astme još uvek nije poznata.

1.1.3.2. Bronhijalna hiperreaktivnost (BHR)

Prekomerna reaktivnost disajnih puteva na različite stimulse igra centralnu ulogu u patofiziologiji astme. Pacijenti sa BHR imaju veći rizik od razvoja astme, mada svi pacijenti sa bronhijalnom hiperreaktivnošću nemaju simptome astme (17). Populaciona studija koja je rađena kod odraslih i dece pokazala je da je prevalencija astme dva do tri puta niža od prevalencije BHR-a (18). Ovi rezultati pokazuju da astma i BHR nisu isti fenomen. Hiperreaktivnost disajnih puteva je potrebna, ali nije dovoljna za razvoj kliničke slike astme.

1.1.3.3. Pol

U dečijem uzrastu, astma je češća kod dečaka, a predominacija muškog pola naročito je izražena u periodu puberteta (19). U ranoj mladosti, tačnije posle 20. godine života, astma je podjednako zastupljena kod oba pola, da bi posle 40. godine života bila češće prisutna kod žena. Povećana učestalost astme kod dečaka može se objasniti većom učestalošću atopije kod muškog pola (IgE-senzibilizacija), uжим disajnim putevima kod dečaka u odnosu na devojčice, te razlikom u percepciji simptoma između dečaka i devojčica (20).

1.1.3.4. Atopija i alergeni

Atopija, odnosno genetska sklonost ka stvaranju visokih koncentracija antitela klase IgE u kontaktu s alergenima iz okoline, jeste najsnažniji potvrđeni faktor rizika za razvoj astme (21). Smatra se da čak 75–90% astme u dečijem uzrastu ima u osnovi atopiju (22–23). Atopija se manifestuje povećanom koncentracijom ukupnih (uIgE) i specifičnih (sIgE) IgE antitela u serumu i pozitivnim odgovorom pri kožnom ubodnom testu na niz standardizovanih inhalacijskih i/ili nutritivnih alergena. Izloženost alergenima je važan faktor rizika za razvoj alergijske preosetljivosti, a kod preosetljivih osoba kontakt s alergenima dovodi do pogoršanja astme i/ili perzistiranja simptoma bolesti (24).

Alergeni zatvorenih prostora su grinje iz kućne prašine, proteini poreklom od kućnih ljubimaca (mačka, pas), bubašvaba i buđ. Najčešći alergeni zatvorenih prostora koji se dovode u vezu sa astmom su piroglifidne grinje *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras* i *Euroglyphus marineri*. Koncentracija grinja iznad 0,5 µg/g prašine dovoljna je da izazove preosetljivost (25). Izloženost alergenima poreklom od kućnih ljubimaca (mačka i pas) u ranom detinjstvu može biti rizična, ali i zaštitni faktor za razvoj astme u odraslom životnom dobu (26–27).

Glavni alergeni spoljašnje sredine koji se dovode u vezu sa astmom su poleni drveća, trava i korova. Njihova koncentracija varira u zavisnosti od geografske širine i atmosferskih prilika, a mape polena se menjaju kao posledica klimatskih i kulturoloških faktora i migracije stanovništva (28).

1.1.3.5. Infekcije disajnih puteva

Podaci o povezanosti i uticaju respiratornih infekcija na razvoj astme su kontradiktorni. Infekcije respiratornim sincicijalnim virusom (RSV), virusom parainfluence, kao i humanim metapneumovirusom u ranom detinjstvu važan su faktor rizika za razvoj astme i alergije u kasnijim godinama (29–30).

Prospektivne studije su pokazale da će čak 40% dece sa potvrđenom infekcijom RSV imati astmu ili simptome slične astmi kasnije u detinjstvu (29). Nasuprot tome, epidemiološke studije sprovedene na grupi dece koja su nasumice izabrana jasno ukazuju da česte respiratorne infekcije u ranom detinjstvu mogu smanjiti rizik za razvoj astme u kasnijoj životnoj dobi, čak i kod dece sa pozitivnom porodičnom anamnezom u pravcu atopije (31–34). Slično tome, česte respiratorne infekcije blagog toka, pretežno gornjih disajnih puteva kod dece iz porodica sa više članova i dece koja su rano uključena u kolektiv, deluju protektivno na kasniji razvoj astme, alergijskog rinitisa i atopijskog dermatitisa (34–35).

Ova zapažanja istraživači su pokušali da objasne 1989. godine takozvanom „higijenskom teorijom“ (13). Visoki higijenski standardi, porodice sa malim brojem članova, kasniji polazak deteta u kolektiv tj. vrtić, vakcinacija i promene u načinu ishrane dovode do stvaranja „polusterilne“ sredine u kojoj deca žive i takva deca su manje izložena virusnim i bakterijskim patogenima, naročito endotoksinu u ranom detinjstvu (36–38).

Endotoksin i druge komponente ćelijskog zida bakterija reaguju sa antigen prezentujućim ćelijama i indukuju interleukinom 12 (IL-12) stimulisan signal za sazrevanje nezrelih T -ćelija u pravcu Th 1 fenotipa. Zbog toga, način života koji za posledicu ima nedovoljnu stimulaciju Th1 limfocita, dovodi do zadržavanja profila Th2 citokina (inače prisutan *in utero*) i povećanog rizika za razvoj alergijske preosetljivosti i astme (39).

1.1.3.6. Gojaznost

Poslednjih decenija evidentan je porast prevalencije astme i gojaznosti. Međutim, njihova povezanost još uvek nije potpuno razjašnjena zbog metodoloških nedostataka sprovedenih istraživanja (40). Neke studije pokazuju da pacijenti sa povećanim indeksom telesne mase (BMI, eng. *Body Mass Index*) imaju veći rizik od razvoja astme (41–42). Rizik je veći za razvoj nealergijske astme u odnosu na alergijsku astmu (43).

Povišena vrednost BMI takođe može biti povezana sa težinom astme (44). Uočeno je da je kod gojaznih astmatičara posle redukcije telesne težine došlo do smanjenja subjektivnog osećanja dispneje, poboljšanja spirometrijskih parametara ispitivanih plućnih funkcija, manjih varijacija u vrednostima vršnog ekspirijumskog protoka vazduha (PEF), manje potrebe za primenom kratkodelujućih beta-2 agonista i ređe pojave egzacerbacije astme (45).

1.1.3.7. Izlaganje duvanskom dimu

Pasivno pušenje, pre svega pušenje majki koje su tokom prve godine života u najbliskijem kontaktu s decom, jedan je od najsnažnijih faktora rizika za pojavu rekurentnog kašlja i šištanja (wheezing) kod predškolske dece i povećava rizik za nastanak astme za 37% (46).

Duvanski dim povećava oksidativni stres i podstiče inflamaciju u disajnim putevima, a pušenje majke u trudnoći za posledicu ima slabiji razvoj pluća kod deteta, što predstavlja faktor rizika za ponavljane epizode šištanja u detinjstvu (47). Takođe, izloženost duvanskom dimu ima negativan uticaj na težinu astme, a uočen je i slabiji odgovor na antiinflamatornu terapiju (48–49).

1.1.3.8. Perinatalni faktori

Brojni perinatalni faktori, kao što su prevremeno rođenje, porođaj carskim rezom, starost majke i ishrana tokom trudnoće, obim glave na rođenju, novorođenačka žutica i upotreba antibiotika tokom prve godine života povezuju se sa razvojem astme u dečijem uzrastu. Povećan uIgE u krvi pupčanika i pozitivna porodična anamneza o prisustvu atopije povezani su sa razvojem atopijske bolesti u detinjstvu (50).

Retrospektivne studije i metaanalize su pokazale da prevremeno rođena deca imaju povećani rizik da obole od astme u kasnijem detinjstvu (51). Istraživanja su pokazala da i porođaj carskim rezom povećava rizik za pojavu astme kod dece (52). Mediteranska ishrana u trudnoći smanjuje rizik za razvoj atopijskih bolesti i simptoma

nalik astmi u dečijem uzrastu (53). Prehrana bogata vitaminom D, cinkom i drugim antioksidansima smanjuje rizik za razvoj *wheezing-a* u ranom detinjstvu (54–56), dok smanjeni unos vitamina E tokom trudnoće povećava rizik za pojavu astme kod dece (56). Uočeno je da je rizik za razvoj *wheezing-a* tokom prve godine života veći kod dece majki mlađih od 30 godina (57).

Retrospektivna studija grupe ispitanika od 11 321 dece pokazala je da novorođenačka žutica takođe predstavlja faktor rizika za astmu kod dece (58). Jasno je pokazana korist od prirodne ishrane odojčadi i rađene metaanalize pokazuju da dojenje ima zaštitni efekat za razvoj atopijskih bolesti, naročito kod dece sa visokim rizikom (deca iz porodica u kojima roditelji i/ili braća i sestre imaju neku alergijsku bolest) (59). Primena mlečne formule koja predstavlja ekstenzivni proteinski hidrolizat i izbegavanje alergogene hrane (kravlje mleko, jaja, žitarice, orašasti plodovi) u odojačkom uzrastu, nemaju efekat na prevenciju astme (60).

1.1.3.9. Zagađenost vazduha

Zagađivači vazduha, kao što su azotni oksidi, kiseli aerosoli, ozon i sumpor-dioksid povezani su sa simptomima astme i pojavom egzacerbacija astme. Zagađivači životne sredine mogu pospešiti nastanak bronhospazma, prolazno povećati BHR i alergijski odgovor, a mogu biti i uzročnici egzacerbacija astme. Iako je astma češća u industrijski razvijenim zemljama, postoji malo dokaza da je zagađenje vazduha direktno odgovorno za povećanje prevalencije astme u ovim zemljama (61).

Prema nekim studijama zagađivači karakteristični za zatvoren prostor, kao što su oksidi azota, ugljen-monoksid, ugljen-dioksid, sumpor-dioksid, formaldehid i endotoksin, takođe mogu doprineti razvoju astme (62–63).

1.1.4. Patofiziologija astme

Za astmu je karakteristična reverzibilna opstrukcija bronha, trajna BHR, zapaljenje i remodelovanje bronha, kao rezultat preteranog odgovora disajnih puteva na stimulus iz spoljašnje sredine (alergen, iritans).

1.1.4.1. Zapaljenje disajnih puteva

Zapaljenje u astmi je posredovano brojnim ćelijama i medijatorima zapaljenja. Medijatori su sastavni deo unutarćelijskih signalnih puteva koji omogućavaju komunikaciju među ćelijama dovodeći ili do sanacije zapaljenske reakcije ili nastanka hroničnog zapaljenja sa trajnim oštećenjem tkiva.

Tri vrste ćelija su ključne u alergijskoj inflamaciji: eozinofilni granulociti, mastociti i T limfociti odnosno Th2-ćelije. Svaka od ovih ćelija otpušta medijatore zapaljenja, kao što su eozinofilni katjonski protein (ECP, eng. *Eosinophil Cationic Protein*) iz eozinofilnih granulocita i histamin iz mastocita ili *de novo* stvorene medijatore zapaljenja (leukotrijeni, prostaglandini) i citokine (interleukini). Zapaljenska reakcija se odvija u dve faze (64).

Posle udisanja antigena, dendritične ćelije, odnosno antigen prezentujuće ćelije (APC, eng. *Antigen Presenting Cells*), predstavljaju antigen T limfocitima u sklopu molekula druge klase glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC-II, eng. *Major Histocompatibility Complex class II*). T-limfociti tipa CD4 prepoznaju antigene pomoću specifičnih T-receptora (TCR, eng. *T cell receptor*) zbog čega dolazi do diferencijacije i aktivacije Th limfocita. Subpopulacija T pomoćničkih limfocita T (Th2-limfociti) produkcijom citokina indukuju sintezu antitela IgE klase u B limfocitima, zatim aktiviraju eozinofilne granulocite koji podstiču alergijsku inflamaciju (65).

Interleukini (IL) 4 i 13, koje luče aktivirani T limfociti, su ključni u pokretanju Th2 imunološkog odgovora, učestvuju u aktivaciji i proliferaciji limfocita B koji kao posledicu sintetitišu IgE antitela specifična za navedeni antigen. Pri ponovnom kontaktu s antigenom (sada alergenom) spajanje alergena i specifičnih IgE pričvršćenih na

membrani mastocita, makrofaga i bazofilnih granulocita dovodi do pokretanja zapaljenske alergijske reakcije.

1.1.4.2. Remodelovanje bronha

Remodelovanje bronha je proces koji dovodi do promena u strukturi bronha što ima za posledicu pojavu ireverzibilne opstrukcije bronha. Taj proces podrazumeva hipertrofiju mišića, neoangiogenezu i povećanu prokrvljenost, hroničnu infiltraciju inflamacijskim ćelijama, hiperplaziju fibroblasta, deponovanje kolagena, zadebljanje bazalne membrane i smanjenje elastičnosti zida disajnih puteva. Zadebljanje bazalne membrane je u korelaciji sa težinom bolesti, hroničnim tokom i bronhijalnom hiperreaktivnošću (66).

1.1.5. Dijagnoza astme

Dijagnoza astme u dečijem uzrastu i dalje predstavlja izazov kliničarima zbog raznolikosti kliničke slike i nedostatka „zlatnog standarda“ (67–68). Dijagnoza se postavlja na osnovu porodične anamneze, faktora rizika, opisa simptoma, dijagnostičkih testova i terapijskog odgovora (69).

Postupci dijagnostikovanja astme u dečijem uzrastu uključuju:

1. Istoriju bolesti – anamnezu:

a) lična anamneza (kašalj, zviždanje u grudima, pritisak u grudima, posebno u naporu, noću ili rano ujutro, tokom respiratornih infekcija, kašalj koji se javlja posle smeha/plača, izloženost hladnom vazduhu, učestalost i trajanje simptoma, sezonska odnosno pojava simptoma tokom cele godine, uzrast kada su se simptomi pojavili, progresija simptoma, postojanje simptoma drugih atopijskih bolesti itd.);

b) porodična anamneza (postojanje astme, alergijskog rinitisa, sinuzitisa, polipa u nosu, cistične fibroze);

c) socijalno-epidemiološka anamneza (opis stana ili kuće, grejanje, vlažnost, izloženost grinjama, buđi, kućnim ljubimcima, duvanskom dimu, stepen obrazovanja roditelja, zaposlenost roditelja itd.)

2. Klinički pregled – treba da sadrži opšti status bolesnika uz obavezan status gornjih i donjih disajnih puteva uz merenje vitalnih parametara (broj respiracija u minuti, frekvencija pulsa, saturacija hemoglobina kiseonikom mereno pulsним oksimetrom) (70).

3. Laboratorijsku obradu: određivanje apsolutnog broja eozinofilnih granulocita u krvi, koncentracije ukupnog i specifičnih IgE u serumu, ukoliko postoje mogućnosti određivanje biomarkera iz krvi i ostalih bioloških tečnosti i tkiva (npr. određivanje koncentracije ECP-a u indukovanom sputumu, bronhoalveolarnom lavatu, tečnosti iz nosne šupljine).

4. Alergološko kožno testiranje (kožni prick [ubodni] test) (71).

5. Procenu plućne funkcije: merenje vršnog ekspiratornog protoka (PEF, eng. *Peak Expiratory Flow*), spirometrija kod dece starije od 5 godina, bronhodilatacijski test – procenat reverzibilnosti FEV1 posle primene bronhodilalatora, telesna plektizmografija (za merenje plućnog volumena i rezistencije u disajnim putevima) (72–73).

6. Merenje azot-oksida u izdahnutom vazduhu (FENO, eng. *Fractional exhaled NO*) – prema najnovijim smernicama Evropskog respiratornog udruženja (ERS, eng. *European Respiratory Society*) i Američkog torakalnog društva (ATS, eng. *American Thoracic Society*) preporučuje se kao dodatni, ali ne i obavezan dijagnostički test i važan parametar za kontrolisanje toka bolesti kod dece obolele od astme, kao pokazatelj stepena zapaljenja u disajnim putevima (74).

7. Rendgenski snimak pluća (postero-anteriorni i lateralni) – obično se preporučuje na početku dijagnostičkog ispitivanja dece koja imaju astmu, posebno ako su u egzacerbaciji bolesti ili ako postoje diferencijalno-dijagnostičke dileme. Preporuka je da radiogram pluća svakako treba učiniti ako postoji dilema u pogledu dijagnoze bolesti, kod postojanja sumnje na strano telo, bronhiolitis, cističnu fibrozu itd. (75).

1.1.5.1. Diferencijalna dijagnoza astme

Kod diferencijalne dijagnoze astme kod dece potrebno je isključiti ili dokazati sledeće bolesti: aspiracija stranog tela, cistična fibroza, strukturne abnormalnosti gornjih i donjih disajnih puteva, imunodeficijencije i bolesti koje su često povezane sa astmom kao što je gastroezofagealna refluksna bolest, alergijski rinitisi i/ili sinuzitis, poremećaji disanja u snu (opstruktivna apneja u snu, hipoventilacioni sindrom) itd. (76).

1.1.6. Fenotipovi i endotipovi astme

Fenotipovi, odnosno podtipovi astme, odlikuju se određenim kliničkim i morfološkim karakteristikama bolesti, i za razliku od endotipova astme nisu direktno uzrokovani patofiziološkim mehanizmima same bolesti. Endotipom se smatraju vrste astme koje karakteriše molekularna heterogenost nastala kao posledica različite imunopatogeneze i/ili terapijskog odgovora. Svaki endotip može obuhvatati više fenotipova astme, kao što i određeni fenotipovi mogu biti prisutni u više endotipova.

Prepoznavanje određenih fenotipova i endotipova astme kod dece važno je zbog izbora adekvatne terapije i praćenja efekta primenjenog terapijskog izbora. Preklapanje pojedinih fenotipova astme, nedostatak specifičnih biomarkera, menjanje fenotipova tokom rasta i razvoja deteta, kao i neprepoznavanje predominantnog tipa zapaljenja, još uvek onemogućava potpuno individualizovani pristup lečenju astme kod dece (77).

Prema PRACTALL konsenzusu (eng. *Practicing Allergology*) o dečjoj astmi, a koja predstavlja prvu međunarodno prihvaćenu smernicu fokusiranu samo na astmu kod dece, uzrast i pokretači astme su dva kriterijuma koja predstavljaju temelj fenotipizacije astme kod dece. Uzrast je jedan od najsnažnijih parametara za fenotipizaciju astme kod dece i uključuje patofiziologiju, izloženost faktorima iz spoljašnje sredine i prirodni tok bolesti. Zbog različite prezentacije bolesti u zavisnosti od uzrasta deteta, potrebno je razmatranje u odvojenim uzrasnim grupama:

- mala deca (0–2 godine)
- predškolska deca (2–6 godina)

- školska deca (6–12 godina)
- adolescenti

Prema PRACTALL smernicama (67), na osnovu dominantnog pokretača astme, kod dece starije od 2 godine, predložena su 4 različita fenotipa astme: astma indukovana virusima, astma indukovana naporom, alergijska astma i još uvek nerazjašnjena astma (npr. moguće uzrokovana različitim iritansima).

Smernice Globalne inicijative za astmu (GINA) 2016. za decu stariju od 6 godina, adolescente i odrasle ukazuju na sledeće fenotipove astme:

- Alergijska astma: ovo je najčešće prepoznati fenotip astme koji često počinje u detinjstvu i povezan je sa ličnom i/ili porodičnom istorijom alergijskih bolesti, kao što su: ekcem, alergijski rinitis ili prisustvo alergije na hranu ili lek. Ispitivanje indukovano sputuma ovih pacijenata pre lečenja često otkriva eozinofilnu inflamaciju disajnih puteva. Pacijenti sa ovim fenotipom astme obično dobro reaguju na terapiju inhalacionim kortikosteroidom (ICS).

- Nealergijska astma: fenotip astme koja nije povezana sa alergijom, prisutna u odraslom životnom dobu. Ćelijski profil ispitivanog sputuma ovih pacijenata može biti neutrofilan, eozinofilan ili sadržati samo nekoliko zapaljenskih ćelija (paucigranulocitni). Pacijenti sa nealergijskom astmom često slabije reaguju na ICS.

- Astma sa kasnim početkom : kod nekih odraslih , naročito žena , astma se prvi put dijagnostikuje u odrasloj dobi . Ovi pacijenti imaju tendenciju da budu nealergični i često zahtevaju veće doze ICS -a ili su relativno refraktorni na terapiju kortikosteroidima.

- Astma sa fiksnom opstrukcijom disajnih puteva: neki pacijenti sa dugotrajnom astmom razvijaju fiksnu opstrukciju disajnih puteva za koju se smatra da je posledica remodelovanja zida disajnih puteva.

- Astma kod gojaznih: neki gojazni pacijenti sa astmom imaju izražene respiratorne simptome i eozinofilno zapaljenje disajnih puteva (8).

1.1.7. PODELA ASTME

1.1.7.1. Podela astme prema težini bolesti

Smernice Globalne inicijative za astmu (GINA) 2016. kategorišu težinu astme kao blagu, umerenu ili tešku. Težina bolesti se retrospektivno procenjuje prema nivou terapije kojom se postiže kontrola simptoma i kontrola egzacerbacija:

- Blaga astma: dobro kontrolisana primenom koraka 1 ili koraka 2 preporučenog stepeničastog pristupa u lečenju tj. pomoću kratkodelujućeg bronhodilatatora inhalacijom po potrebi ili primenom terapije za kontrolu niskog intenziteta, kao što su ICS u niskim dozama, antagonisti leukotrienskih receptora ili kromoni.
- Umerena astma: dobro kontrolisana primenom koraka 3, na primer fiksna kombinacija niskih doza ICS/dugodelujući bronhodilatator (LABA) kao terapija održavanja i po potrebi SABA.
- Teška astma: zahteva korak 4 ili 5 u terapijskom pristupu npr. visoka doza ICS/LABA kako bi se sprečilo da postane „nekontrolisana“ ili astma koja ostaje „nekontrolisana“ uprkos ovom tretmanu. Kod mnogih pacijenata astma je loše kontrolisana zbog neadekvatnog i neodgovarajućeg tretmana i i upornog problema sa komorbiditetima, kao što je hronični rinosinuitis ili gojaznost. Prema Evropskom respiratornom udruženju i Američkom torakalnom udruženju definicija teške astme treba da bude rezervisana za pacijente sa refraktarnom astmom i za one kod kojih je odgovor na terapiju, uprkos lečenju komorbiditeta, nepotpun (78).

1.1.7.2. Podela astme prema stepenu kontrole

Prema stepenu kontrole bolesti, GINA smernice predlažu podelu astme na kontrolisanu, delimično kontrolisanu i nekontrolisanu, tabela 1.

Tabela br.1. Podela astme prema stepenu kontrole

Karakteristike	Kontrolisana	Delimično kontrolisana (svako svojstvo/nedeljno)*	Nekontrolisana
Dnevni simptomi	Nema (2x ili manje nedeljno)	Više od 2x nedeljno	3x ili više karakteristika delimično kontrolisano nedeljno**
Ograničena aktivnost	Nema	Svaka	
Noćni simptomi	Nema	Svaki	
Potreba za kratkodelujućim β 2 agonistom	Nema (2x ili manje nedeljno)	Više od 2x nedeljno	
Plućna funkcija (FEV1 ili PEF)	Normalna	<80%	
Egzacerbacije	Nema	1 ili više godišnje**	Nedeljno***

FEV1 - forsirani ekspirijumski volumen vazduha izdahnut u prvoj sekundi; PEF – vršni ekspirijumski protok.

* nedeljno se odnosi na bilo koju od poslednje kontrole

** potrebna revizija terapije

*** u bilo kojoj nedelji od poslednje kontrole

Preporučeni parametri za praćenje kontrole astme kod dece prema ERS/ATS smernicama su: broj dana bez simptoma, potreba za kratko delujućim beta-2 agonistima (SABA), vrednost forsiranog ekspiratornog volumena u 1. sekundi (FEV1) pre i posle primene bronhodilatatora, egzacerbacije (u poslednje 1–4 nedelje), upitnik o kontroli astme (ACT, eng. *Asthma Control Test*), kvalitet života, hiperreaktivnost disajnih puteva, biomarkeri, nuspojave lekova, upotreba sistemskih kortikosteroida (CS), posete pedijatru (hitna ambulanta ili hospitalizacija), mortalitet zbog astme (79).

1.1.7.2.1. Dijagnostičke metode za praćenje aktivnosti astme

1.1.7.2.1.1. Spirometrija

Spirometrija je metod kojim se meri zapremina plućnog vazdušnog prostora i brzina protoka vazduha kroz disajne puteve. U retrospektivnoj studiji kojom je bilo obuhvaćeno 13 842 dece progresivno smanjenje egzacerbacija astme bilo je povezano s porastom forsiranog ekspiratornog volumena u 1. sekundi (FEV1, eng. *Forced Expiratory Volume in 1 second*). FEV1 je takođe bio nezavisni prediktivni faktor egzacerbacija astme, tako da su deca sa FEV1<60% imali dva puta veću verovatnoću da će imati napad astme u sledećoj godini nego deca koja su imala FEV1>80% (80).

1.1.7.2.1.2. Ukupni IgE

Alergija je usko povezana s astmom kod dece. U studiji koja je ispitivala 216 dece, kod 88,2% ispitanika dokazana je preosetljivost na barem jedan alergen. Intenzitet alergijske preosetljivosti nije bio povezan s težinom astme. Ukupni IgE je bio značajno povećan kod dece koja su lečena kortikosteroidima, kao i kod dece koja su bila hospitalizovana zbog astme. Ti rezultati ukazuju da visoka koncentracija uIgE može biti povezana s teškom astmom kod dece (81). U studiji koja je ispitivala 190 bolesnika s alergijskom astmom logaritam koncentracije uIgE bio je značajno viši kod ispitanika s nekontrolisanom astmom. Koncentracija uIgE je ostala povećana uprkos terapiji inhalacijskim kortikosteroidima i to u dozi značajno višoj u poređenju sa dozom ICS u terapiji ispitanika s dobro kontrolisanom astmom. Takođe, logaritam uIgE je bio povezan s povećanim brojem eozinofilnih granulocita u krvi i smanjenim vrednostima FEV1 i to u grupi dece sa nekontrolisanom astmom (82).

1.1.7.2.1.3. Testovi za ocenu subjektivnog doživljaja simptoma astme: ACT/AQLQ testovi

Psihometrijska pomagala koja su validizovana potrebna su za objektivnu procenu subjektivnog doživljaja bolesti. Jedan od njih je i upitnik o kontroli astme (ACT eng. *Asthma Control Test*) koji služi za procenu kontrole astme. Taj test sadrži 5–7 pitanja (zavisno od uzrasta deteta) na koja odgovaraju bolesnik i roditelji (za decu uzrasta 4–11 godina). Namenjen je za identifikaciju dece sa nedovoljno kontrolisanom astmom (83).

Postoje i detaljniji upitnici o kvalitetu života koji daju značajno precizniji uvid o subjektivnom doživljaju bolesti. Jedan od takvih upitnika koji ocenjuje kvalitet života vezano za bolest je upitnik autorke *Elizabeth F. Juniper* (AQLQ, eng. *Asthma Quality of Life Questionnaire*) koji je sastavljen kako bi odredio veličinu problema koje deca u uzrastu od 7. do 17. godina imaju zbog astme (84).

1.1.8. EGZACERBACIJA ASTME

Egzacerbacija astme podrazumeva akutnu ili subakutnu epizodu progresivnog pogoršanja simptoma bolesti povezanu sa opstrukcijom disajnih puteva (85). Egzacerbacije mogu varirati od blagog, kratkotrajnog pogoršanja praćeno g nadražajnim kašljem i blagim šištanjem, pa sve do veoma teškog, po život opasnog stanja (8).

1.1.9. LEČENJE ASTME

Za lečenje astme kod dece primenjuju se GINA smernice, PRACTALL smernice i smernice Internacionalnog konsenzusa za pedijatrijsku astmu (eng. *International consensus on [ICON] pediatric asthma*) (8, 67, 85). Za lečenje astme kod dece preporučuje se pristup kojim se obuhvataju sve bitne komponente lečenja kako bi se postigla dobra ili potpuna kontrola bolesti. Takav pristup lečenju astme kod dece uključuje: edukaciju dece i roditelja, prepoznavanje i izbegavanje provocirajućih faktora, primenu odgovarajućih lekova, prepoznavanje bolesnika pogodnih za lečenje

alergen-specifičnom imunoterapijom ili biološkom terapijom (85). Izbor odgovarajućeg lečenja zavisi od težine bolesti (blaga, umerena i teška astma), stepena reverzibilnosti, aktivnosti bolesti (egzacerbacije povezane sa virusnim infekcijama, izloženosti alergenima ili fizičkim naporom) i uzrasta kada se bolest javila (odojački period, detinjstvo ili odrasla dob) (9).

1.1.9.1. Farmakoterapija astme kod dece

Cilj lečenja astme jeste kontrola simptoma i prevencija egzacerbacija uz minimum neželjenih efekata primenjenih lekova (8). Farmakoterapija astme se zasniva na saznanju da je opstrukcija disajnih puteva u astmi uzrokovana spazmom bronhijalnih mišića uz različit stepen upale disajnih puteva, edem, pojačanu produkciju sekreta i infiltraciju ćelijama zapaljenja.

S tim u vezi, lekovi za astmu se mogu podeliti u dve velike grupe lekova:

- Simptomatski lekovi (*reliever medications*) koji služe za lečenje akutnog napada bronhoopstrukcije. Simptomatski lekovi su: beta-2 agonisti kratkog delovanja (SABA, eng. *Short-Acting Beta agonist*) i ostali bronhodilatatori, a kod nas je salbutamol najčešće primenjivani lek.
- Osnovni lekovi (*controller medications*) koji deluju na alergijsko zapaljenje u disajnim putevima i imaju za cilj da spreče pogoršanje bolesti. Lekovi za kontrolu su: inhalacijski kortikosteroidi (ICS, eng. *Inhalatory CorticoSteroids*), antagonisti leukotrijenskih receptora (LTRA, eng. *LeukoTriene Receptor Antagonist*) i beta-2 agonisti dugog delovanja (LABA, eng. *Long-Acting Beta agonist*) (8, 67).

ICS značajno smanjuju simptome astme, potrebu za primenom beta-2 agonista kratkog delovanja, poboljšavaju plućnu funkciju, smanjuju učestalost i težinu egzacerbacija, kao i potrebu za hospitalizacijom zbog pogoršanja astme (86). Većina dece sa blagom astmom je dobro kontrolisana primenom niskih doza ICS. Srednje visokim dnevnim dozama ICS smatraju se doze koje su dvostruko više od niskih doza, a visokim dozama smatraju se četverostruko više od niskih doza. Izuzetak su

triamcinolon i flunizolid, za koje se trostruko više doze od niskih doza smatraju visokim dozama.

Kada se postigne kontrola astme kod bolesnika, dozu ICS je potrebno postepeno snižavati, do najnižih doza kojima se ostvaruje efekat. Optimalnu dozu koja je delotvorna potrebno je odrediti individualno za svakog pojedinačnog bolesnika uzimajući u obzir pri tome njihove potencijalne lokalne (orofaringealna kandidijaza, disfonija, kašalj zbog iritacije gornjih disajnih puteva) i sistemske neželjene efekte (adrenalna supresija, osteoporoza, katarakta, pojava modrica po koži) (8).

Iz grupe lekova koji pripadaju leukotrijenskim antagonistima (LTRA) u lečenju astme kod dece u našoj zemlji primenjuje se montelukast. Montelukast je dokazano delotvoran u kontroli simptoma astme, poboljšanju plućne funkcije, prevenciji pogoršanja stanja i hospitalizacije zbog astme (87, 88).

Beta-2 agonisti dugog delovanja, salmeterol i formeterol, u lečenju astme kod dece primenjuju se samo u fiksnim kombinacijama sa ICS i to u lečenju astme kod dece starije od 5 godina. Lečenje primenom fiksne kombinacije ICS+LABA ima bolji učinak na kontrolu astme nego povećanje doze ICS-a (89, 90).

Imunoterapija specifična za alergen (SIT) sprovodi se primenom rastućih doza ekstrakta alergena s ciljem da se izazove trajna klinička tolerancija kod bolesnika koji su na isti alergen specifično senzibilisani. Danas se sprovodi na dva osnovna načina: davanjem alergenskog ekstrakta ispod kože (supkutana imunoterapija) ili pod jezik (sublingvalna imunoterapija). Dokazan je klinički efekat SIT kod dece s alergijskom astmom i/ili alergijskim rinitisom/rinokonjunktivitisom, kod dece koja su alergična na grinje, polene drveća, trava ili korova, kao i na dlaku mačke, posebno ako su deca monosenzibilisana na neki od navedenih alergena (91).

1.1.10. BETA 2 AGONISTI

Beta adrenergični lekovi su najefikasniji bronhodilatatori koji su trenutno odobreni za kliničku upotrebu kod astme. Među beta agonistima, pojedinačni agensi variraju u brzini početka i trajanju delovanja. Inhalirani kratkodelujući, selektivni beta-2 adrenergični agonisti su glavna akutna terapija astme, dok inhalirani, dugotrajni, selektivni beta-2 adrenergični agonisti (u kombinaciji sa inhalacijama glukokortikoida) igraju ulogu u dugotrajnoj kontroli umerene do teške astme (92).

1.1.10.1 Kratkodelujući beta-2 agonisti

Agonisti beta-2 adrenergičkih receptora sa kratkim dejstvom (SABA) mogu se podeliti u dve široke grupe prema trajanju delovanja posle inhalacije konvencionalnih doza:

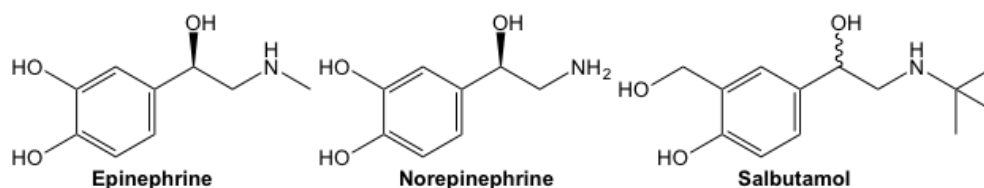
- 1) kateholamini izoprenalin i rimiterol, koji imaju veoma kratako dejstvo od 1 do 2 sata;
- 2) lekovi koji su konvencionalno opisani kao kratkodelujući, kao što su salbutamol, fenoterol, i terbutalin, koji su aktivni od 3 do 6 sati, iako delovanje fenoterola može biti nešto duže (93).

U svakom slučaju, trajanje delovanja svih agonista ADRB2 povećava se sa dozom tako da 1600 µg inhaliranog salbutamola, na primer, ima značajno duže dejstvo od 200 µg istog leka (94).

1.1.10.1.1. Salbutamol

Salbutamol deluje na ADRB2, čiji su prirodni ligandi epinefrin i norepinefrin. Tačnije, epinefrin se veže 15 puta jače za receptor nego norepinefrin, pa je to dominantni ligand. Salbutamol je lek koji je dizajniran da izgleda kao epinefrin i norepinefrin, tako da se vezuje za isto aktivno mesto (slika br 1).

Slika br. 1. Molekulska struktura salbutamola



Salbutamol koji ima sekundarnu amino grupu, kao i epinefrin, jeste parcijalni agonist beta-2 adrenoceptora. Delimični agonist se vezuje za isti receptor kao prirodni ligand, ali je nesposoban da postigne istu efikasnost. Salbutamol (takođe poznat i kao albuterol) je delimični agonist receptora, verovatno zato što se njegov aromatični prsten ne vezuje sa aktivnim mestom, kao i prirodni ligandi, što dovodi do drugačije konformacijske promene receptora i različitih nivoa aktivnosti (95). Studije su pokazale da je salbutamol manje efikasan od epinefrina, ali bronhodilacijski efekti epinefrina slabe posle oko 30 min., tako da dejstvo može prestati dok stimulus bronhokonstrikcije još uvek postoji. Dejstvo salbutamola, s druge strane, je duže, što je mnogo korisnije za lečenje akutnog napada astme. Takođe, epinefrin ima mnogo više mesta delovanja i, kao rezultat toga, neželjeni efekti su brojniji nego kada je salbutamol u pitanju (95). Zbog toga je salbutamol lek izbora, a ne epinefrin, u terapiji napada astme, iako se radi o delimičnom agonistu.

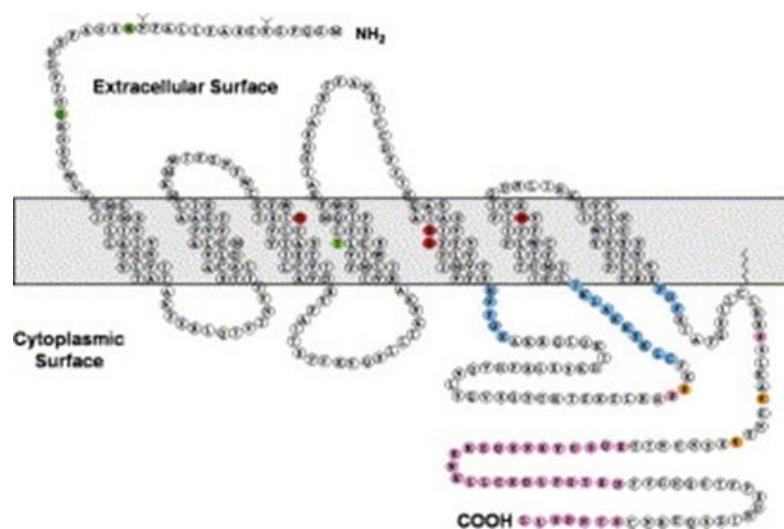
Salbutamol se udiše u obliku aerosola, a deluje na beta-2 adrenorgičke receptore u glatkim mišićima koji okružuju bronhije. Posle inhalacije salbutamola, maksimalna bronhodilacija se može videti u roku od 15 minuta od inhalacije (96). Međutim, salbutamol se slabo vezuje za receptor i brzo difunduje u mikrocirkulaciju. Ovo je posledica kratkog trajanja efekta (4–6 sati) (97). Ipak, zbog brze pojave dejstva salbutamol se smatra lekom izbora u akutnoj terapiji bronhospazma. Odsustvo odgovora na primenjenu terapiju i pojava ozbiljnog pogoršanja bolesti zahteva prijem u bolnicu, a u najtežim slučajevima u jedinicu za pedijatrijsko intenzivno lečenje. Zbog toga je predviđanje odgovora na specifičnu terapiju od velikog značaja u lečenju pogoršanja astme kod dece (98).

Salbutamol se vezuje nekovalentno za aktivno mesto u receptoru i stabilizuje receptor u svom aktivnom stanju. Receptor provodi više vremena u stabilizovanom aktivnom stanju i tako čini više cAMP-a. cAMP pokreće intracelularne kaskade , završavajući oslobađanjem K^+ i smanjujući slobodni intracelularni Ca^{2+} , što ometa sposobnost mišića da odgovore. Jednom kada se odvoji od receptora, salbutamol deluje i na druge beta-2 receptore pre inaktivacije u jetri i želucu. Hronična izloženost agonistima dovodi do značajnog smanjenja broja ADRB2 na površini ćelije.

1.1.11.2. Beta-2 adrenergički receptor

Kod ljudi se gen za beta-2 adrenergički receptor nalazi na dugom kraku hromozoma 5 i kodira informacionu RNK od približno 1 200 baznih parova (99). Protein se sastoji od 413 aminokiselinskih ostataka i molekulske mase je približno 46 500 daltona. Kao i svi G-proteinski receptori, beta-2 receptor ima 7 α -heliksa koji se protežu kroz ćelijsku membranu (100). Amino-terminus i 3 ekstracelularne petlje se nalaze sa spoljašnje, a karboksi-terminus i 3 intracelularne petlje sa unutrašnje strane membrane (slika br. 2)

Slika br 2. Beta-2 adrenergički receptor



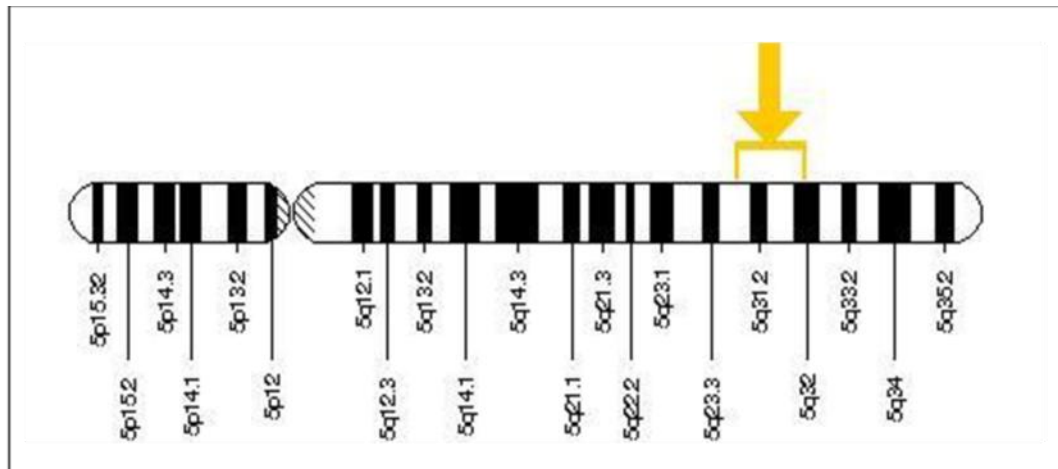
Autoradiografska ispitivanja pluća kod ljudi pokazala su da su beta-2 adrenergički receptori široko rasprostranjeni i javljaju se, ne samo u glatkim mišićima disajnih puteva (30–40 000 po ćeliji), već i na drugim ćelijama u plućima, kao što su epitelne i endotelne ćelije, ćelije tipa II i mastociti. Međutim, gustina receptora je najveća na glatkim mišićima. Studije vezivanja radioliganda na uzorcima tkiva pluća dobijenih posle lobektomije pluća pokazale su da se gustina beta-2 receptora povećava kroz respiratorni trakt, sa visokim nivoima u centralnom delu pluća i alveolarnom regionu (101). Kompjuterizovano tomografsko skeniranje potvrdilo je ovu distribuciju beta-2 receptora u disajnim putevima.

Pozitronska emisiona tomografija (PET) omogućila je neinvazivnu kvantifikaciju beta-2 receptora *in vivo* i korelaciju sa kliničkim odgovorom. Serijska merenja pokazala su da je gustina beta-2 receptora veća nego u kardijalnom tkivu. Međutim, nije pokazana razlika u gustini između zdravih subjekata i astmatičnih pacijenata, ali je zabeležena inverzna veza između vrednosti FEV1 i gustine beta-2 receptora u plućima (102). Ispitivan je broj mononuklearnih leukocitnih beta-2 adrenergičnih receptora u mirovanju i posle vežbanja kod dece sa astmom (103). Značajan je negativan odnos koji je pronađen između broja receptora i maksimalnog procentualnog smanjenja FEV1, a značajan pozitivan odnos je pronađen između broja receptora i maksimalnog volumena upotrebljenog kiseonika po kilogramu u minuti. Ovi rezultati sugerišu da smanjeni broj beta-2 receptora može doprineti patogenezi astme izazvane fizičkim naporom.

1.1.11.3. Normalna regulacija receptora

Gen za beta-2 adrenergički receptor (ADRB2) se nalazi na hromozomu 5q31-q32, u regionu koji je povezan sa astmom (slika br. 3).

Slika br. 3. Lokacija ADRB2 gena na hromozomu 5

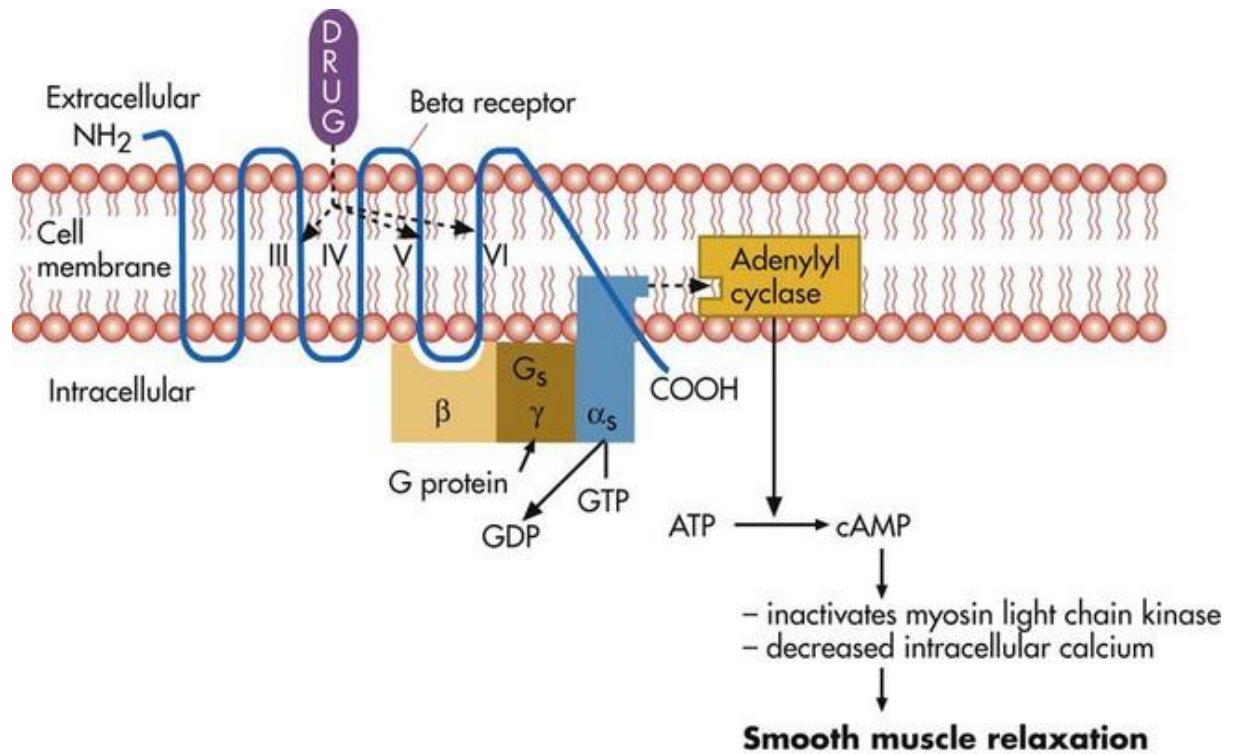


Od šezdesetih godina dvadesetog veka prihvaćena je teorija da je aktivacija beta-2 receptora posredovana povećanim intracelularnim nivoima cikličnog adenzin monofosfata (cAMP, eng. *cyclic adenosine monophosphate*) (104). Ovo je rezultat stimulacije adenilat ciklaze, koja katalizuje konverziju adenzin trifosfata u cAMP. Spajanje beta-2 receptora sa adenilat ciklazom se obavlja kroz trimerni Gs protein, koji se sastoji od α -podjedinice (koja stimuliše adenilat ciklazu) i $\beta\gamma$ -podjedinice (koja prenosi druge signale). Nivoi cAMP se zatim regulišu kroz aktivnost izozima/izofорма fosfodiesteraze, koji ga degradiraju do 5'-AMP (105).

Mehanizam kojim cAMP indukuje relaksaciju ćelija mišića disajnih puteva nije u potpunosti shvaćen, ali se veruje da katalizuje aktivaciju protein kinaze A (PKA eng. *protein kinase A*), koja zauzvrat fosforiliše ključne regulatorne proteine koji su uključeni u kontrolu tonusa mišića (105). Povećani nivo cAMP takođe rezultira inhibicijom otpuštanja jona kalcijuma (Ca^{2+}) iz intracelularnih depoa, smanjenjem unosa membranskog Ca^{2+} i sekvestracijom intracelularnog Ca^{2+} , što dovodi do opuštanja glatkih mišića u disajnim putevima. Međutim, nedavno je otkriveno da neki od relaksantnih odgovora na beta-2 agoniste mogu biti posredovani putem mehanizama nezavisno od cAMP-a koji uključuju direktnu interakciju Gs sa kalijumskim kanalima, koji su prisutni u ćelijskoj membrani glatkih mišića disajnih puteva.

Iako većina delovanja beta-2 receptora izgleda kao da je posredovana kroz Gs proteine i cAMP-zavisni PKA sistem, beta-2 receptori mogu takođe da udvostruče Gi proteine, što dovodi do stimulacije ekstracelularne regulacije kinaznog signala i p38 mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (MAPK, eng. *mitogen-activated protein kinase*) (106). Aktivacija ovog puta od strane beta-2 receptora zahteva da se receptor fosforiliše pomoću PKA u čemu važnu ulogu imaju $\beta\gamma$ -podjedinice G-proteina koji deluju kao prenosna sklopka za brojne intracelularne proteine, uključujući citoplazmatične tirozin-kinaze cSrc, Raf i RAS, koje dominiraju u stimulaciji MAPK-a (106). Ovaj mehanizam može služiti razdvajanju beta-2 receptora od Gs i na taj način predstavljati sredstvo za završetak signala i reakcije beta-2 agonist/receptor. Pored toga, sada postoje dokazi da MAPK aktivira beta-2 receptor, fosforiliše glukokortikoidni receptor (GR, eng. *glucocorticoid receptor*) tako što fosforiliše serinske ostatke na N-terminusu receptora, što dovodi do rezultata u kome receptor postaje više osetljiv na steroid-zavisnu aktivaciju (107). Aktivacija beta-2 receptora takođe povećava translokaciju GR iz citoplazme u nukleus ćelije, što je osnovni korak u antiinflamatornoj aktivnosti kortikosteroida. Ovo je posredovano aktivacijom CCAAT/enhanser-vezujućeg proteina (C/EBPa). Ovi mehanizmi pružaju molekularnu osnovu za sinergiju između beta-2 receptora i GR (108).

Slika br. 4. Aktivacija ADRB2



Najvažniji klinički efekat aktivacije ADRB2 od strane agonista ADRB2 u glatkim mišićima pluća je opuštanje glatkih mišića disajnih puteva.

Ekspresija beta-2 adrenergičnih receptora i njihovo povezivanje sa intracelularnim signalnim putevima su dinamički regulisani, pružajući negativnu povratnu spregu koja smanjuje reakciju ćelija na dugotrajn u izloženost receptora agonistima. Fosforilacija receptora, bilo putem PKA-zavisnih puteva ili aktiviranjem proteina iz familije G-proteinskih receptorskih kinaza nazvanog kinaza beta-adrenergičkog receptora (beta-ARKs), dovodi do smanjenog povezivanja sa intracelularnim signalnim putem posle stimulacije agonistima. Kod različitih tkiva uočena je razlika u stepenu aktivacije pri produženom izlaganju agonistu, verovatno zbog razlika u količini i dejstvu beta-ARK i/ili PKA u različitim tipovima ćelija. Hronično izlaganje ovim agonistima dovodi do značajnog smanjenja broja ADRB2 na površini ćelije. Takav vid regulacije ogleda se *in vivo* kao tolerancija na dejstvo agonista ADRB2.

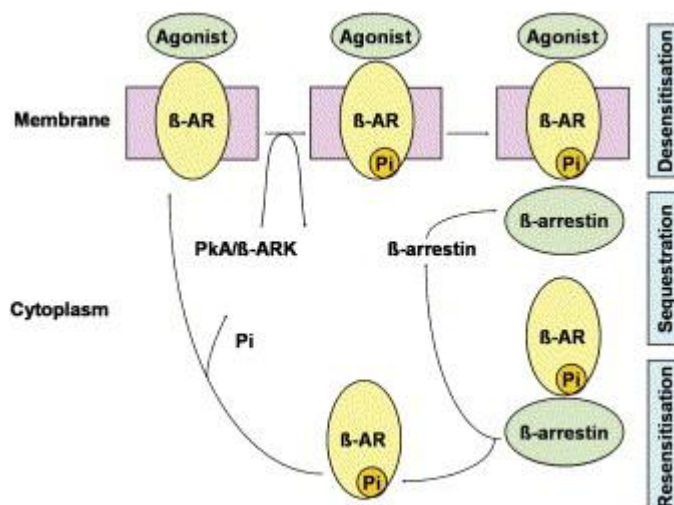
1.1.11.4. Interakcija beta-2 receptora/agonista

Molekularna struktura beta-2 agonista određuje način na koji interaguje sa beta-2 adrenoceptorom. Kratkodelujući beta-2 agonisti, kao što je salbutamol, koji su prirodno hidrofilni, pristupaju aktivnom mestu beta-2 adrenoceptora direktno iz ekstracelularnog vodenog prostora (108). Zbog toga oni imaju brzi početak delovanja. Međutim, njihov boravak na aktivnom mestu receptora je ograničen, što kao rezultat ima kraće trajanje bronhodilatatornog dejstva (4–6 sati). Dugotrajni beta-2 agonisti imaju različite mehanizme delovanja . Na primer , formoterol je umereno lipofilni i uzima se u ćelijsku membranu u obliku depoa , odakle progresivno izlazi na interakciju sa aktivnim mestom beta-2 receptora. Veličina depoa je određena koncentracijom ili načinom primene leka. Početak delovanja dugodelujućeg beta-2 agonista je odložen u poređenju sa kratkodelujućim beta-2 agonistom, a trajanje aktivnosti je duže i zavisno je od koncentracije (108).

1.1.11.5. Desenzibilizacija beta-2 receptora

U vezi sa aktivacijom beta-2 adrenoceptora je autoregulatorni proces desenzitizacije receptora. Ovaj postupak funkcioniše kao sigurnosni mehanizam koji sprečava preveliku stimulaciju receptora u slučaju prekomerne izloženosti beta-2 agonistu. Desenzibilizacija se javlja kao odgovor na asocijaciju receptora sa molekulom agonista (109). Mehanizmi pomoću kojih se može dogoditi desenzibilizacija sastoje se od 3 glavna procesa: 1) razdvajanje receptora od adenilat ciklaze, 2) internalizacija aktiviranih receptora i (3) fosforilacija internalizovanih receptora (slika br. 5). Obim desenzitizacije zavisi od stepena i trajanja odgovora beta-2 adrenoceptora/beta-2 agonista. Ovaj jednostavni oblik desenzitizacije je prolazni proces i može se promeniti u roku od nekoliko minuta od uklanjanja agonista (110).

Slika br. 5. Desenzibilizacija ADRB2



Posle vezivanja beta-2 agonista, PKA, beta adrenoceptor kinaza ili oba fosforiliraju beta-2 receptor, što dovodi do desenzitizacije. Vezivanje beta arestina se stimuliše, a dobijeni kompleks beta-2 receptor/beta arestin je izolovan od površine ćelije i internalizovan. Tada je receptor defosforilisan, bet arestin se dislocira, a beta-2 receptor se reciklira nazad u membranu. *ADRB2*, beta-2 adrenergični receptor; *Pi*, fosforilacija

Posle nekoliko sati izlaganja agonistu, javlja se gubitak ćelijskih receptora (eng. *downregulation*) kroz nekoliko mehanizama koji su nezavisni od fosforilacije receptora. Ubikvitinacija beta-2 receptora se odvija posredstvom E3 ubikvitin-protein ligaze, koja aktivira proces degradacije receptora. Zbog toga je potrebna aktivacija transkripcije gena da bi se obnovili membranski beta-2 receptori. Danas je prihvaćeno mišljenje da pored procesa desenzitizacije koji negativno regulišu funkciju samog beta-2 receptorskog proteina, beta-2 receptor/agonisti, koji deluju kroz cAMP put, takođe modeliraju ekspresiju gena za beta-2 receptor (110).

1.1.11.6. Polimorfizmi u *ADRB2* genu

U literaturi su opisani polimorfizmi u genu za *ADRB2* koji menjaju ponašanje receptora posle ekspozicije agonistu. Glavni klinički interes polimorfizama leži u tome da mogu determinisati stepen tzv. *down* regulacije receptora u disajnim putevima i da kao takav polimorfizam može modifikovati bronhodilatatorni odgovor na primenjeni beta-2 agonist.

Dosadašnja istraživanja identifikovala su 9 različitih polimorfizama, od kojih 4 predstavljaju bazne zamene koje dovode do promene aminokiselinske sekvence receptorskog proteina (111). Tri od ovih polimorfizama (Slika br. 1) izgleda da menjaju funkcionalne osobine receptora, tako da se od disajnih puteva osoba koje imaju ove oblike receptora, može očekivati da se ponašaju drugačije kada su izloženi egzogeno primenjenim beta-2 agonistima.

Dva najčešća polimorfizma u ADRB₂ genu su + 46A> G (Arg16Gly, rs1042713) i + 79C> G (Gln27Glu; rs1042714) (112). Postoje dokazi da polimorfizmi + 46A> G i + 79C> G menjaju funkcionisanje receptora, što dovodi do poremećaja u regulaciji ADRB₂ i time indukuje otpornost na efekat beta-2 agonista (113).

Inicijalna istraživanja su fokusirana na aminokiselinu 16 koja može biti ili arginin (Arg) ili glicin (Gly), a podaci pokazuju da Gly 16 receptor ispoljava „down“ regulaciju posle izlaganja agonistu u mnogo većoj meri od oblika Arg 16 u oba transfektovana ćelijska sistema i u primarnim kultivisanim ćelijama glatkih mišića disajnih puteva (111). Rezultati dve kliničke studije ukazuju da je Gly 16 tip receptora povezan sa markerima težeg oblika astme. Preliminarni podaci holandskih porodica sa astmom ukazuju na to da Gly 16 može biti povezan sa hiperreaktivnošću disajnih puteva (114). Pored toga, pacijenti sa izraženim noćnim simptomima astme verovatno imaju oblik Gly 16 receptora za razliku od osoba sa astmom koji nemaju izražene noćne simptome i pad vrednosti vršnog ekspirijumskog protoka u toku noći (115). Učestalost alela za Arg 16 i Gly 16 su 35% i 65%.

Neke od studija su pokazale odnos između polimorfizma Arg16Gly i kliničkog odgovora na beta-2 agoniste. Kod 10 od 14 ispitanika sa nerezistentnim genotipovima (Gly16Gly i Gly16Arg), došlo je do značajnog smanjenja beta-2 adrenoceptora u plućima, što je procenjeno pomoću PET skeniranja, a posle 2 nedelje primene salbutamola. Četiri osobe koje su bile heterozigoti za polimorfizam Glu 27 nisu ispoljile „down“ regulaciju beta-2 receptora u plućima (116). Međutim, u poređenju sa decom koja su bila homozigoti za Gly 16, ispitanici koji su homozigoti za Arg 16 bili su 5,3, a heterozigoti za Arg16Gly 2,3 puta sa boljim odgovorom na salbutamol (117). Slično tome, homozigot Gly 16 bio je značajno skloniji toleranciji na primenu bronhodilatatora od Arg 16 posle primene dugodelujućeg beta-2 agonista (118).

Međutim, druge studije su pokazale oprečne rezultate. Naime, ispitanici sa Arg16Arg polimorfnim oblikom receptora pokazali su progresivno smanjenje bronhodilatatornog odgovora na primenu salbutamola u uobičajenoj dozi, a i poboljšanje plućne funkcije kada je primena beta-2 agonista bila prekinuta (119). Gly 16 homozigoti nisu pokazali takve odgovore. Slično tome, prisustvo Arg/Arg, ali ne i Gly/Gly, bilo je povezano sa povećanom učestalošću pogoršanja astme kod pacijenata koji su primali salbutamol (120).

Drugi polimorfizam je na poziciji 27, koji postoji kao glutamin (Gln) ili kao glutamat (Glu). Učestalost alela Gln 27 i Glu 27 je 55% i 45% (115). Za razliku od Gly 16, istraživanja ukazuju da Glu 27 oblik štiti od „down“ regulacije receptora. Korišćenjem primarnih kultivisanih ćelija glatkih mišića disajnih puteva, posle produžene izloženosti beta-2 agonistima, Glu 27 se smanjuje u mnogo manjoj meri od Gln 27 receptora, što je procenjeno promenama broja receptora (115). U grupi ispitanika sa blagom do umerenom astmom, osobe sa tipom receptora Glu 27 imale su 4 puta manje reaktivne disajne puteve od onih sa Gln 27 posle metaholinskog testa. Kada se homozigot Glu 27, koji se predviđa da štiti od desenzibilizacije receptora, kombinuje sa homozigotom Gly 16, efekti Gly 16 su dominantni (114).

Treći polimorfizam je na poziciji 164, koji može biti treonin (Thr) ili izoleucin (Ile). Ovaj polimorfizam je mnogo ređi nego na aminokiselinama 16 ili 27, sa alelnom frekvencijom od oko 1%, ali potencijalno je interesantna aminokiselina 164 koja se nalazi u četvrtom domenu transmembranskog prolaza i koja se nalazi pored serina 165 koji je predviđen za interakciju sa OH grupama adrenergičnih liganda (115). Ovaj polimorfizam je proučavan u transfektovanom ćelijskom sistemu i pokazalo je da menja agonist-vezujuća svojstva receptora. Utvrđeno je da ćelijske ekspresije Ile 164 imaju približno 4 puta manje afiniteta za ligande. Ova promena afiniteta vezivanja ogledala se u smanjenom kapacitetu receptora da aktivira adenilat ciklazu, u odnosu na formu receptora Thr 164 (121). Postoji samo nekoliko kliničkih podataka koji su na raspolaganju da bi se procenila važnost ovog polimorfizma.

Interesantni su rezultati skorijeg istraživanja koje je pokazalo veoma značajnu interakciju između polimorfizma Ile772Met adenilat ciklaze 9 i bronhodilatatornog odgovora na salbutamol kod dece koja imaju astmu i inhalirani budezonid u terapiji

(122). Ovo ukazuje na to da genotip može uticati na signalizaciju beta-2 receptora kada su beta-2 agonisti i kortikosteroidi inhalirani istovremeno.

S obzirom na to da je većina osoba heterozigot i da su polimorfizmi Arg 16Gly i Gln27Glu su prisutni sa različitom učestalošću, neophodna su ispitivanja velikih populacija kako bi se odredila važnost polimorfizma ADRB2 za fenotip astme. Polimorfizam +46G> A može biti važan faktor u ukupnom genetičkom riziku razvijanja astme, dok je polimorfizam +79C> G opisan kao faktor rizika za astmu kod odraslih u nekim etničkim grupama (123–125). Prethodna studija u srpskoj populaciji pokazala je da odrasli nosioci alela +79C i genotip +79CC imaju povećan rizik od razvoja astme (126).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

1. Utvrditi učestalost polimorfizama +46A>C (Arg16Gly) i +79C>G (Gln27Glu) u genu za ADRB2 kod dece sa astmom.
2. Poređenje sa objavljenim podacima za populaciju zdravih osoba mlađih od 50 godina u Srbiji.
3. Utvrditi uticaj ovih polimorfizama na težinu astme.
4. Utvrditi uticaj ovih polimorfizama na bronhodilatatorni odgovor na salbutamol.
5. Utvrditi da li u ispitivanoj populaciji pacijenata postoje neke mutacije unutar analiziranog dela ADRB2 koje nisu prethodno opisane.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje predstavlja studiju preseka koja je sprovedena u Službi za pulmologiju i alergologiju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu u periodu od oktobra 2016. do maja 2017. godine, uz odobrenje Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (odluka br: 29/III-30, 28/3/2016).

3.1. Ispitanici

U istraživanje su uključena 54 deteta uzrasta od 6 do 18 godina koja su bolnički i ambulantno lečena u Službi za pulmologiju i alergologiju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu, sa postavljenom dijagnozom astme unazad najmanje godinu dana u skladu sa GINA 2016 smernicama (8). Roditelji svih ispitanika obavešteni su o cilju istraživanja i od njih je dobijena pismena saglasnost. Ispitanici su klasifikovani prema težini bolesti u skladu sa GINA 2016 smernicama u tri podgrupe (8):

- 1) Ispitanici sa blagom astmom: dobro kontrolisani primenom terapijske preporuke iz koraka 1 ili 2 iz GINA 2016 smernice za lečenje astme (po potrebi primena kratko delujući bronhodilatator (SABA) ili primena niskih doza ICS ili primenom antagonista leukotrienskih receptora (LTRA)).
- 2) Ispitanici sa umerenom astmom: dobro kontrolisana primenom koraka 3 (niska doza fiksne kombinacije ICS/LABA ili niska doza ICS + LTRA, a za decu od 6 do 11 godina srednja doza ICS i po potrebi SABA).
- 3) Ispitanici sa teškom astmom: dobro kontrolisana primenom koraka 4 ili 5 iz GINA 2016 smernice (srednja/visoka doza ICS/LABA ili visoka doza ICS + LTRA ± dodatna terapija oralni kortikosteroidi (OCS)).

Parametri alergijske osnove astme bili su ko-pojava atopijskog dermatitisa, pozitivni kožni „prick“ testovi na inhalacijske alergene, povišen nivo serumskog IgE, prisustvo više od 4% eozinofila u perifernoj krvi u odsustvu parazita (tri negativne analize stolice za parazite tri meseca pre testiranja). Učestvovali su samo ispitanici čiji su roditelji ili zakonski staratelji potpisali informisani pristanak i koji nisu imali nijedan od kriterijuma

za isključivanje iz istraživanja. Nijedan od ispitanika nije imao akutno pogoršanje bolesti. Svi ispitanici su u imali kontrolisnu astmu u poslednje 4 nedelje.

Kontrolna grupa zdravih osoba sa kojom je učinjeno poređenje učestalosti polimorfizama kod dece sa astmom bila je grupa od 106 zdravih odraslih osoba oba pola, službenika na redovnom godišnjem sistematskom pregledu u Domu zdravlja „Stari grad“ u Beogradu, u periodu septembar–oktobar 2011. godine. Podaci o karakteristikama ispitanika kontrolne grupe preuzeti su iz istraživanja dr Nataše Petrović Stanojević i saradnika koje je objavljeno 2014. godine (126). Ovo je učinjeno u skladu sa potpisanom izjavom autora dr Nataše Petrović Stanojević o korišćenju podataka prema odabranom tipu licence Kreativne zajednice u Beogradu 23.5.2016. godine.

3.1.1. Kriterijumi za isključenje

Kriterijumi za isključenje bili su: prisustvo neke druge bolesti disajnih puteva, gastroezofagealna refluksna bolest (GERB), šećerna bolest, sistemske bolesti vezivnog tkiva, tumori, zatim gojaznost (BMI>85. percentila za pol i uzrast) (127), lečena infekcija disajnih puteva četiri nedelje pre početka istraživanja, kao i sva druga stanja koja bi potencijalno mogla uticati na rezultate dijagnostičkih testova za procenu plućnih funkcija.

Pored navedenog, iz ispitivanja su isključena deca koja su pokazala nesaradnju pri izvođenju dijagnostičkih testova (spirometrija) ili su odustali na vlastiti zahtev (deteta i/ili roditelja).

3.2. Metode ispitivanja

3.2.1. Anamneza i klinički pregled

Anamneza je uključivala sledeće podatke: postojanje i učestalost simptoma astme, vrednosti PEF-a, redovnost uzimanja propisane terapije, egzacerbacije u prethodnih godinu dana i hospitalizacije zbog astme unazad godinu dana. S obzirom na

složenost definisanja egzacerbacije astme u dečijem uzrastu (ATS/ERS), u ovom istraživanju egzacerbacija astme podrazumeva: pogoršanje simptoma, pogoršanje vrednosti spirometrijskih merenja (odnosno PEF-a) i povećanu potrebu za kratko delujućim beta-2 agonistima. Iz porodične anamneze analizirani su podaci o prisustvu astme kod roditelja i/ili braće/sestara, a iz socio-epidemiološke anamneze podaci o intrauterinoj izloženosti duvanskom dimu kao i o trenutnoj pasivnoj izloženosti duvanskom dimu.

Za procenu kontrole astme upotrebljeni su upitnik o kontroli astme za decu uzrasta od 4 do 11 godina (C-ACT, eng. *Childhood Asthma Control Test*) i upitnik o kontroli astme za decu od 12 godina i više (ACT, eng. *Asthma Control Test*) (128, 129). Prema podacima iz literature, za oba testa zbir bodova ≤ 19 otkriva nekontrolisanu astmu u poslednje 4 nedelje (130).

Klinički pregled – vitalni znaci, pregled glave, vrata, grudnog koša, a po potrebi i ostalih delova tela u skladu sa pravilima kliničke propedeutike.

3.2.2. Laboratorijska ispitivanja

U uzorcima periferne krvi dobijenim venepunkcijom analizirani su sledeći parametri: diferencijalna krvna slika (DKS) i ukupni IgE. DKS je određivan morfološkom analizom krvnog razmaza. Koncentracija ukupnog IgE određivana je enzim-imunohemijskom metodom na mikročesticama (MEIA, Abbott).

Senzibilizacija na najčešće inhalatorne alergene (grinje, kućna prašina, polen trava, polen ambrozije, polen drveća, buđ, perje, izlučevine bubašvabe, dlaka mačke i dlaka psa) procenjivana je kožnim ubodnim testiranjem (SPT, eng. *skin prick test*). Za testiranje su korišćeni alergeni proizvedeni u Institutu za virusologiju i imunologiju Torlak u Beogradu. Pozitivnim testom na alergen smatrana je pojava papule veličine od 3 ili više mm ili veće od one izazvane fiziološkim rastvorom kao negativnom kontrolom.

3.2.3. Spirometrija

Testovi plućne funkcije sprovedeni su pomoću spirometrijske jedinice *GANSHORN-SCHILLER SpiroJet* (140091, Nemačka). Spirometrija je sprovedena prema standardima ATS/ERS (131). Analizirani su: FVC – forsirani vitalni kapacitet; FEV1 – volumen vazduha izdahnut u prvoj sekundi; PEF – vršni ekspiratorni protok vazduha; MEF75 – maksimalni protok vazduha u izdahu pri 75% FVC-a; MEF50 – maksimalni protok vazduha u izdahu pri 50% FVC-a; MEF25 – maksimalni protok vazduha u izdahu pri 25% FVC-a. Rezultati spirometrije su prikazani kao procenti predviđenih vrednosti u skladu sa ATS/ERS preporukama, a koje se koriste u Univerzitetскоj dečjoj klinici u svakodnevnoj kliničkoj praksi (131).

Deca sa astmom su dobila instrukciju da prekinu primenu terapije za kontrolu bolesti 72 sata pre testiranja, kao i upotrebu kratkododelujućih beta-2 agonista 12 sati pre testiranja što je bio deo metodologije u prethodno publikovanim rezultatima istraživanja kod dece sa astmom (132).

Bronhodilatacijski odgovor na primenjen kratkododelujući beta-2 agonist procenjivan je primenom jedne doze salbutamola (0,15mg/kg) pomoću električnog nebulizatora *Omron Nebuliser* (NE-C28P-E) i ispitivanjem plućne funkcije pre i 15 minuta posle primene nebulizovanog salbutamola kod svakog deteta. Bronhodilatacijski odgovor je meren registrovanjem promene u procentu FEV1 pre i posle primene salbutamola. Procentualna razlika FEV1 (dFEV1) posle i pre primene salbutamola dobijena je upotrebom formule: $[(FEV1 \text{ (posle bronhodilatatora)} - FEV1 \text{ pre bronhodilatatora}) / FEV1 \text{ pre bronhodilatatora}] \times 100$. Praćenje promene FEV1 posle primene salbutamola kao mera odgovora na primenu beta-2 agonista je najobjektivniji, neposredni i najčešće proučavani parametar plućne funkcije u dosadašnjim ispitivanjima (80, 131).

3.2.4. Genotipizacija ADRB2 +46A>G (Arg16Gly) i +79C> G (Gln27Glu) polimorfizama

Genomska DNK je ekstrahovana iz periferne krvi pomoću *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific). Prisustvo +46G> A i +79C> G polimorfizama/varijanti određeno je direktnim sekvenciranjem DNK proizvoda PCR reakcije dobijenih sledećim graničnicima: 5'-CTGAATGAGGCTTCCAGGCGT-3' i 5'-ACAATCCACACCATCAGAAT-3'. PCR je sproveden u reakcionoj mešavini od 50µL koja sadrži: 1X KAPA Taq Buffer A (KAPA Biosystems), 0.3mM MgCl₂, 0.2mM svaki dNTP, 10pmol svakog graničnika, 2U KAPA Taq DNK polimeraze (KAPA Biosystems) i približno 300ng DNK.

Reakcija umnožavanja je izvođena u sledećim uslovima: početna denaturacija 5 min. na 94°C; 35 ciklusa koji se sastoje od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 60°C i 30 sekundi na 72°C; konačno elongacija 10 minuta na 72°C. Dobijeni PCR fragmenti (dužine 584bp) pročišćeni su pomoću *PureLink PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific) i sekvencirani pomoću *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific) i istih graničnika koji su korišćeni za amplifikaciju. Proizvodi reakcije sekvenciranja su analizirani pomoću kapilarne elektroforeze na 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) i Sequencing Analysis Software v5.3.1 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems).

3.3. Statistička analiza

Kategorijalne varijable su prikazane apsolutnim brojevima i procentima. Kontinuirane numeričke varijable su prikazane sa aritmetičkom sredinom±standardna devijacija (SD), a diskontinuirane sa medijanom i opsegom vrednosti. Normalnost raspodele je testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom i grafičkim metodama. Za utvrđivanje postojanja značajnosti razlike između grupa dece koje imaju blag, umeren i težak oblik astme u odnosu na polimorfizme +46A>G i +79C>G u ADRB2 genu korišćen je χ^2 test. Za testiranje hipoteze o postojanju značajnosti razlike u vrednosti

dFEV1 u odnosu na različite genotipove polimorfizama korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) *Kruskal-Wallis* test, a za *post hoc* testiranje je korišćen *Mann-Whitney U* test.

Za upisivanje, rangiranje, grupisanje i tabelarno i grafičko prikazivanje korišćen je Excel program iz Microsoft Office 2013 programskog paketa (Microsoft, SAD).

Statistička analiza izvršena je korišćenjem Statističkog paketa za društvene nauke 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, SAD). Podaci su izraženi kao procenti i aritmetička sredina \pm standardna devijacija (SD) za kontinualne varijable i procenete za kategoričke varijable. Da bi se testirala normalna vrednost parametara korišćen je jedan uzorak Kolmogorov-Smirnov testa. Razlike između grupa za kategoričke podatke su testirane pomoću Hi kvadrat analize, dok su za kontinualne podatke korišćeni testovi: *Mann-Whitney U* i *Kruskal Vallis* test. *Hardi-Weinberg*-ova ravnoteža distribucije posmatranih polimorfizama +46A>G i +79C>G je analizirana pomoću softvera *Arlekuin*.

Za statistički značajnu smatrana je vrednost manja od 0,05 za tip-1 statističke greške (alfa) za dvosmerno testiranje hipoteze.

4. REZULTATI

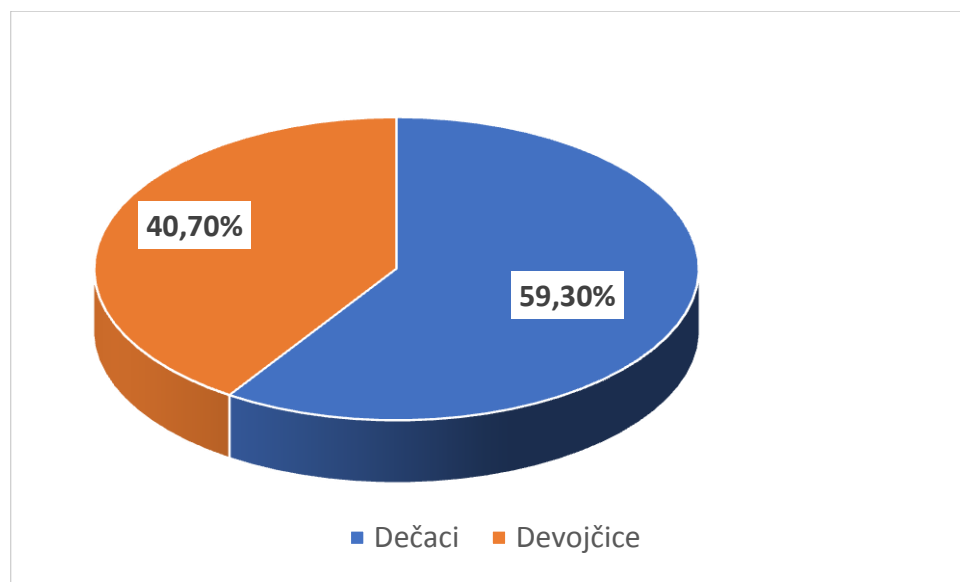
4.1. Karakteristike ispitivane populacije i distribucija učestalosti ispitivanih polimorfizama

U studiju je uključeno 54 deteta oba pola sa dijagnostikovanom astmom, prosečne starosti $11,9 \pm 2,7$. Demografske karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje prikazane su u tabeli 2.

Tabela 2. Demografske karakteristike ispitanika

Pol	n (%)	Starost (AS \pm SD), godine
Dečaci	32 (59,3%)	11,9 \pm 2,4
Devojčice	22 (40,7%)	11,9 \pm 3,1
Ukupno	54 (100%)	11,9 \pm 2,7

n-broj, AS-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija



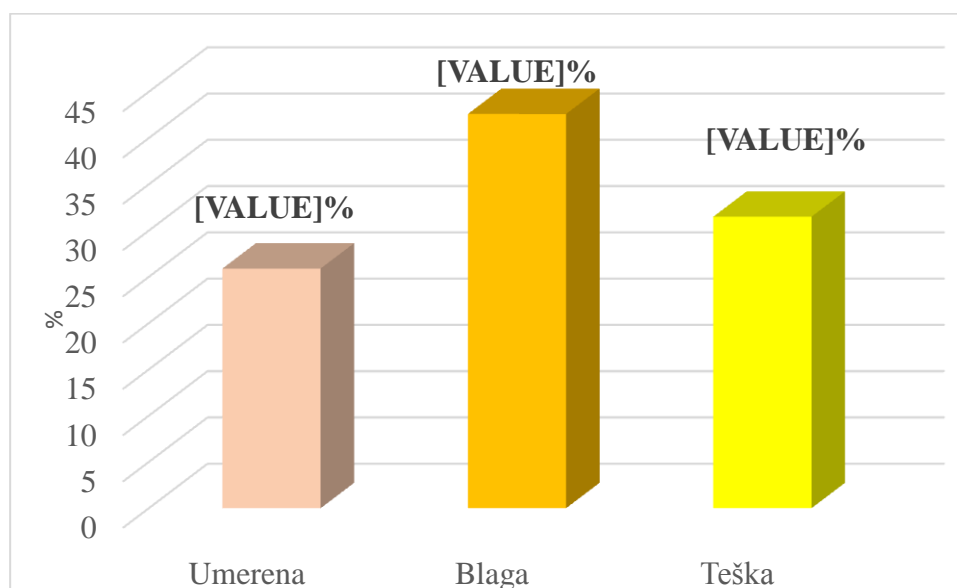
Grafikon 1. Dijagram strukture dece sa astmom koja su činila ispitivanu populaciju po polu

Razlika u učestalosti tipova astme prema težini bolesti u odnosu na pol nije statistički značajna. ($\chi^2=1,79$, $df=2$, $p=0,409$). Najviše dece oba pola je imalo blag oblik astme (42,6%).

Tabela 3. Učestalost tipova astme prema težini bolesti u ukupnom uzorku dece i po polu, sa testiranjem značajnosti razlike

Težina astme	Ukupno n (%)	Dečaci	Devojčice	p
Blaga	23 (42,6%)	16 (50%)	7 (31,8%)	0,409 ^a
Umerena	14 (25,9%)	7 (21,9%)	7 (31,8%)	
Teška	17 (31,5%)	9 (28,1%)	8 (36,4%)	
Svega	54 (100%)	32 (100%)	22 (100%)	

n-broj, ^a χ^2 -test



Grafikon 2. Distribucija tipova astme prema težini bolesti u ukupnom uzorku dece

Tabela 4. Učestalost tipova astme prema težini bolesti u odnosu na pozitivnu porodičnu anamnezu sa testiranjem značajnosti razlike

Pozitivna porodična anamneza	Težina astme				p
	Blaga n (%)	Umerena n (%)	Teška n (%)	Svega n (%)	
Da	12 (30,8%)	12(30,8%)	15 (38,5%)	39 (100%)	
Ne	11 (73,3%)	2 (13,3%)	2 (13,3%)	15 (100%)	0,018 ^a
Ukupno	23 (42,6%)	14 (25,9%)	17 (31,5%)	54 (100%)	

n-broj, ^a χ^2 -test

Razlika u učestalosti tipova astme prema težini u odnosu na pozitivnu porodičnu anamnezu je statistički visoko značajna. Najveći procenat dece sa pozitivnom porodičnom anamnezom ima težak oblik astme dok deca koja nemaju pozitivnu porodičnu anamnezu imaju najčešće blag tip astme ($\chi^2=8,05$, $df=2$, $p=0,018$).

Tabela 5. Distribucija tipova astme prema težini bolesti u odnosu na izloženost duvanskom dimu *in utero* u ukupnom uzorku dece

Izloženost duvanskom dimu in utero	Blaga n (%)	Umerena n (%)	Teška n (%)	Ukupno n (%)	p
Da	5 (33,3%)	5 (33,3%)	5 (33,3%)	15 (100%)	
Ne	18 (46,2%)	9 (23,1%)	12 (30,8%)	39 (100%)	0,644 ^a
Ukupno	23 (42,6%)	14 (25,9%)	17 (31,5%)	54 (100%)	

n-broj, ^a χ^2 -test

Razlika u učestalosti tipova astme prema težini u odnosu na izloženost duvanskom dimu *in utero* nije statistički značajna. Najveći procenat dece nije bio izložen duvanskom dimu *in utero* ($\chi^2=0,88$, $df=2$, $p=0,644$).

Atopijski dermatitis je imalo 43 deteta (79,6%). Pozitivne kožne probe na samo jedan alergen imalo je 21 dete (38,9%), a na više inhalacionih alergena 31 dete (57,4%). Dva deteta su bila bez reakcije na kožne probe (tabela 6). Ostale kliničke karakteristike dece su prikazane u tabeli 6.

Tabela 6. Kliničke karakteristike dece sa astmom

Klinički parametar	Ukupno n (%)
Atopijski dermatitis	54 (100%)
Ima	43 (79,6%)
Nema	11 (20,4%)
Pozitivne kožne probe	52 (100%)
<i>Na jedan alergen:</i>	21 (40,4%)
Dermatophagoides	16 (76,2%)
Poleni trava	2 (9,5%)
Buđ	2 (9,5%)
Kućna prašina	1 (4,8%)
<i>Na više alergena:</i>	31 (59,6%)
Serumski IgE , IU/mL (AS±SD)	143,3±49,5
Eozinofili , % (AS±SD)	6,3±2,1

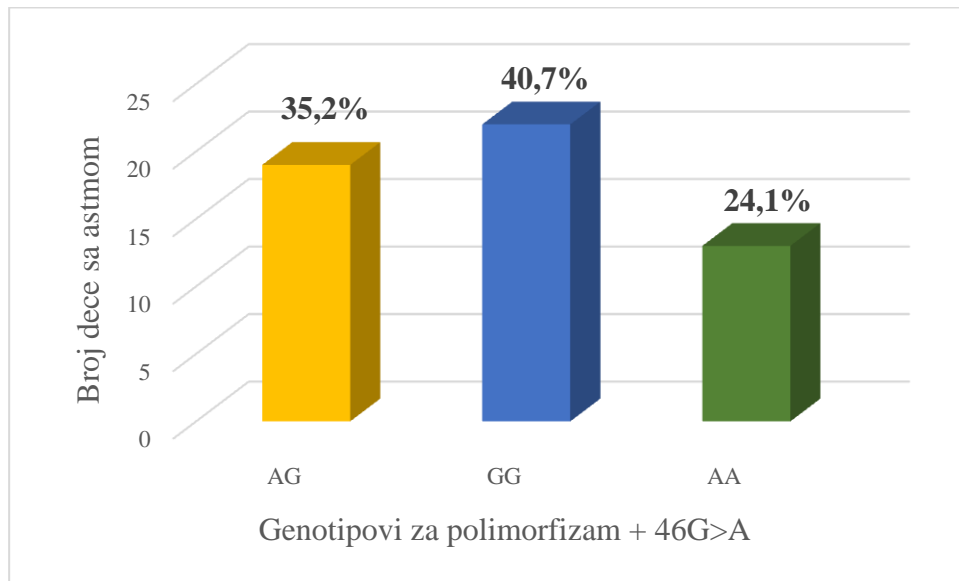
AS-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija

Prisustvo promena u genu ADRB2 je analizirano direktnim sekvenciranjem DNK. Genetičkom analizom je utvrđeno prisustvo varijanti +46A>G (Arg16Gly, rs1042713) i +79C>G (Gln27Glu, rs1042714). U analiziranom segmentu DNK nije otkriveno prisustvo drugih varijanti.

U ispitivanom uzorku dece sa astmom najučestalija kombinacija alela za polimorfizam +46A>G (Arg16Gly, rs1042713) u ADRB2 genu je bila GG (tabela 7, grafikon 3), dok je najučestalija kombinacija alela za polimorfizam +79C>G (Gln27Glu, rs1042714) u ADRB2 genu bila CC (tabela 8, grafikon 4).

Tabela 7. Distribucija učestalosti genotipova za polimorfizam +46A>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom

Polimorfizam +46G> A (Arg16Gly, rs1042713)	Broj dece sa astmom
AG	19
GG	22
AA	13
Ukupno	54

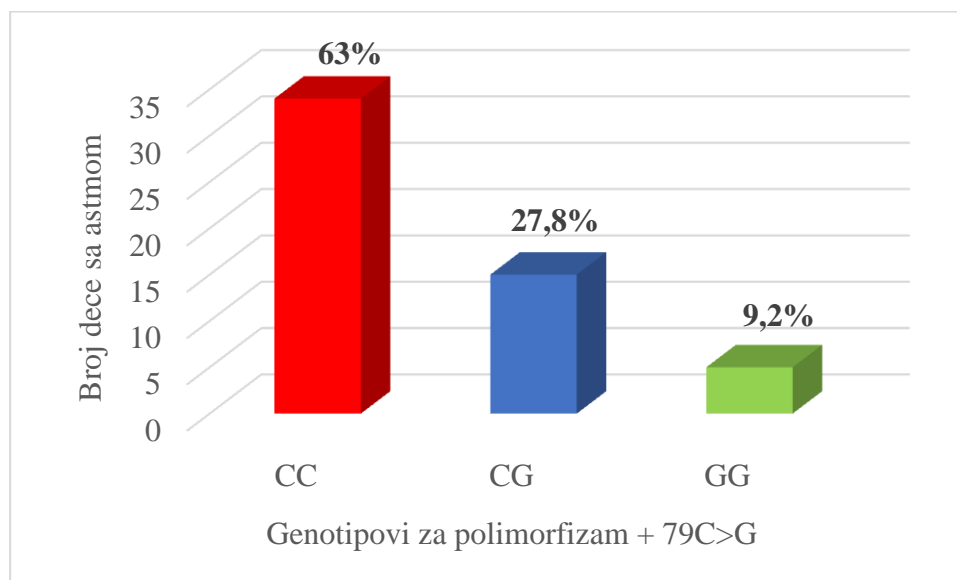


Grafikon 3. Učestalost genotipova za polimorfizam +46G>A u ADRB2 genu kod dece sa astmom

Tabela 8. Distribucija učestalosti genotipova za polimorfizam +79C>G u genu za ADRB2 kod dece sa astmom

Polimorfizam + 79C>G (Gln27Glu, rs1042714)	Broj dece sa astmom
CC	34
CG	15
GG	5

Ukupno	54
--------	----



Grafikon 4. Učestalost genotipova za polimorfizam +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom

Procentualno učešće alela za obe varijante (+46A>G i +79C>G) u genu ADRB2 kod dece sa astmom prikazano je u tabeli 9.

Tabela 9. Procentualno učešće alela za obe varijante u genu ADRB2 kod dece sa astmom

varijanta	alel	%
+46A>G	A	41.7
	G	58.3
+79C>G	C	76.9
	G	23.1

Poređenje učestalosti kombinacija alela za polimorfizam +46A>G (Arg16Gly, rs1042713), kao i za polimorfizam +79C>G (Gln27Glu, rs1042714) u ADRB2 genu dece sa astmom i kontrolne grupe prikazano je u tabeli 10.

Razlika učestalosti kombinacija alela za polimorfizam +46A>G u ADRB2 genu dece sa astmom i kontrolne grupe zdravih osoba nije statistički značajna ($p=0,084$). Statistički je značajna razlika u kombinaciji alela za polimorfizam +79C>G u ADRB2 genu dece sa astmom i kontrolne grupe zdravih osoba ($p<0,001$).

Tabela 10. Poređenje učestalosti kombinacija alela za polimorfizam +46A>G, kao i za polimorfizam +79C>G u ADRB2 genu dece sa astmom i kontrolne grupe

	Deca sa astmom	Kontrolna grupa	p
+46A>G, n(%)	54 (100%)	54 (100%)	
AA	13(24,1)	44(41,5)	0,084 ^a
AG	19(35,2)	26(24,5)	
GG	22(40,7)	36 (34,0)	
+79C>G, n(%)	54 (100%)	54 (100%)	
CC	34(63,0)	17(16,0)	<0,001 ^a
CG	15(27,8)	24(22,6)	
GG	5(9,2)	65(61,4)	

^a χ^2 -test

4.2. Uticaj ispitivanih polimorfizama na težinu astme

Razlika učestalosti tipova astme prema težini bolesti po polimorfizmima +46A>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom je visoko statistički značajna ($\chi^2= 13,3$, $df=4$, $p=0,01$).

Visoko značajno češće se javlja umerena astma kod dece koja imaju AA genotip polimorfizma +46A>G u ADRB2 genu (tabela 11).

Tabela 11. Učestalosti tipova astme prema težini po polimorfizmima +46A>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom

Polimorfizam +46A>G u ADRB2 genu	AA n (%)	GA n (%)	GG n (%)	p

Ukupno po grupama	13 (100)	19 (100)	22 (100)	
Tip astme				
Blaga astma	1 (7,7)	10 (52,6)	12 (54,4)	
Umerena astma	8 (61,5)	3 (15,8)	3 (13,6)	0,01 ^a
Teška astma	4 (30,8)	6 (31,6)	7 (31,8)	
^a χ^2 -test				

Tabela 12. Učestalosti tipova astme prema težini po polimorfizmima +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom

polimorfizam +79C>G u ADRB2 genu	CC n (%)	CG n (%)	GG n (%)	p
Ukupno po grupama	34 (100)	15 (100)	5 (100)	
Tip astme				
Blaga astma	12 (35,3)	8 (53,3)	3 (60)	
Umerena astma	12 (35,3)	2 (13,3)	0 (0)	0,316 ^a
Teška astma	10 (29,4)	5 (33,3)	2 (40,0)	
^a χ^2 -test				

Razlika učestalosti tipova astme po polimorfizmima +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom nije statistički značajna ($\chi^2=4,7$, $df=4$, $p=0,32$).

4.3. Uticaj ispitivanih polimorfizama na bronhodilatatorni odgovor

Dokazana je statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima dFEV1 kod dece sa astmom u odnosu na genotipske varijante +46A>G u ADRB2 genu ($Z=6,23$, $df=2$, $p=0,044$). Razlika u medijanama dFEV1 postoji između genotipova AA i GG polimorfizma +46A>G u ADRB2 genu ($Z=-2,21$, $p=0,027$). Međutim, razlika u prosečnim vrednostima dFEV1 kod dece sa astmom u odnosu na genotipske varijante +79C>G u ADRB2 genu nije statistički značajna ($Z=0,093$, $df=2$, $p=0,995$).

Tabela 13. Uticaj genotipova polimorfizma +46A>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom na bronhodilatatorni odgovor na salbutamol

		+46A>G	AA	GA	GG	p
dFEV1, % (AS±SD)			9,39±6,16	10,42±5,84	14,36±6,12	0,044 ^a
Parovi	post-hoc	Mann	(1-2)	(2-3)	(1-3)	
Withney, U-test			p=0,06	p=0,5	p=0,027	

AS-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija, ^aKruskal-Wallis test

Tabela 14. Uticaj genotipova polimorfizma +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom na bronhodilatatorni odgovor na salbutamol

		+79 C>G	CC	CG	GG	p
dFEV1, % (AS±SD)			11,62±5,89	11,67±7,23	13,2±7,5	0,955 ^a

AS-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija, ^aKruskal-Wallis test

Tabela 15. Distribucija genotipova polimorfizma +46A>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom u odnosu na prisustvo atopijskog dermatitisa

Polimorfizam +46G>A u ADRB2 genu					
Atopijski dermatitis	AA n (%)	GA n (%)	GG n (%)	Svega n (%)	p
Da	12 (27,9%)	13 (30,2%)	18 (41,9%)	43 (100%)	0,244 ^a
Ne	1 (9,1%)	6 (54,5%)	4 (36,1%)	11 (100%)	
<i>Ukupno</i>	<i>13 (24,1%)</i>	<i>19 (35,2%)</i>	<i>22 (40,7%)</i>	<i>54 (100%)</i>	

^a χ^2 -test

Razlika u učestalosti polimorfizama +46A>G i +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom u odnosu na prisustvo atopijskog dermatitisa nije statistički značajna ($\chi^2=2,83$, df=2, p=0,244; $\chi^2= 0,67$, df=2, p= 0,716 respektivno).

Tabela 16. Distribucija polimorfizama +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom na odgovor na salbutamol i odabrane kliničke parametre

Polimorfizam +79C>G u ADRB2 genu					
Atopijski dermatitis	CC n (%)	CG n (%)	GG n (%)	Svega n (%)	p
Da	26 (60,5%)	13 (30,2%)	4 (9,3%)	43 (100%)	0,716 ^a
Ne	8 (72,7%)	2 (18,2%)	1 (9,1%)	11 (100%)	
<i>Ukupno</i>	<i>34(63,0%)</i>	<i>15 (27,8%)</i>	<i>5 (9,3%)</i>	<i>54 (100%)</i>	

^a χ^2 -test

Tabela 17. Korelacija nivoa eozinofila u perifernoj krvi sa genotipovima polimorfizama +46A>G i +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom

	AA n (%)	GA n (%)	GG n (%)	p
Polimorfizam +46A>G u ADRB2 genu				
Eozinofili (%) (AS±SD)	6,03±2,51	6,29±1,66	6,36±2,28	0,600 ^a
Polimorfizam +79 C>G u ADRB2 genu	CC n (%)	CG n (%)	GG n (%)	
Eozinofili (%) (AS±SD)	5,89±1,93	7,1±1,91	6,18±3,39	0,089 ^a

^aKruskal-Wallis test

Razlika u prosečnim vrednostima eozinofila u odnosu na polimorfizme +46A>G i +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom nije statistički značajna ($\chi^2=1,02$, df=2, p=0,600; $\chi^2=4,84$, df=2, p=0,089 respektivno).

Tabela 18. Vrednosti ukupnog IgE iz seruma u odnosu na polimorfizme +46A>G i +79 C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom

	AA	GA	GG	p
Polimorfizam +46A>G u ADRB2 genu	n (%)	n (%)	n (%)	
IgE, IU/mL (AS±SD)	152,43±47,51	128,01±53,34	148,94±49,96	0,440 ^a
Polimorfizam +79 C>G u ADRB2 genu	CC	CG	GG	
	n (%)	n (%)	n (%)	
IgE, IU/mL (AS±SD)	141,24±45,92	134,42±64,68	172,83±42,37	0,543 ^a

^aKruskal-Wallis test

Razlika u vrednostima ukupnog IgE iz seruma u odnosu na polimorfizme +46G>A i +79G>A u ADRB2 genu kod dece sa astmom nije statistički značajna ($\chi^2=1,064$, df=2, p=0,440; $\chi^2=1,22$, df=2, p=0,543 respektivno).

5. DISKUSIJA

Astma je hronična bolest koja danas može uspešno da se leči. To je najčešća hronična bolest u industrijskim zemljama. Ciljevi uspešnog lečenja astme obuhvataju: kontrolu simptoma, normalnu aktivnost uključujući i fizički napor, normalnu plućnu funkciju, prevenciju pogoršanja bolesti, minimum neželjenih dejstava lekova i prevenciju smrtnih ishoda zbog astme (8). Iako su se naša znanja o različitim aspektima astme kod dece značajno proširila poslednjih godina, još uvek je velik procenat dece sa astmom nedovoljno i neadekvatno kontrolisan i lečen (133, 134).

Loša kontrola astme povezana je sa nekontinuiranim lečenjem, nerazumevanjem uzroka astme, negativnim stavom prema bolesti, strahom od primene kortikosteroida, preteranim korišćenjem bronhodilatatora i sa nepotpunim lečenjem astme i pridruženih bolesti kao što je alergijski rinitis, hronični rinosinuzitis i gastroezofagenalni refluks.

Farmakoterapija koja je prilagođena genotipu bolesnika sa astmom treba da rezultira klinički značajnim povećanjem efikasnosti terapije i smanjenjem neželjenih događaja i zbog toga ima važnu ulogu, naročito u lečenju teške astme (135). Beta-agonisti su najčešće korišćeni lekovi u terapiji (8). Shodno tome, ispitivani su i otkriveni polimorfizmi u ADRB2 genu i pokazano je da su povezani sa izmenjenom funkcijom i regulacijom ekspresije beta-2 receptora.

Genetska varijacija u ADRB2 genu može imati značajan uticaj na modulaciju odgovora na inhalirane beta-2 agoniste kao glavnu terapiju astme. Prethodne studije su se bavile ispitivanjem dva najčešća polimorfizma + 46A>G i + 79C>G i njihovim uticajem na diferencijalnu agonistički stimulisanu „down“ regulaciju u receptoru u transfektovanim ćelijama, uključujući ćelije glatkih mišića kod čoveka, kao i ispitivanjem njihove povezanosti sa različitim bronhodilatatornim odgovorom posle primene β 2-agonista (10, 11, 16, 17, 18, 19).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja i različitih rezultata brojnih studija, odlučili smo da u našoj studiji ispitamo kakav uticaj imaju polimorfizmi u ADRB2 genu kod dece sa astmom u Srbiji tako što smo ispitivali bronhodilatatorni odgovor posle

inhaliranog kratkodelujućeg beta-2 agonista, kao i povezanost prisutnih polimorfizama sa težinom astme.

Prema do sada objavljenim podacima u literaturi, frekvencija polimorfizama +46A>G (Arg16Gly) i +79C>G (Gln27Glu) varira među različitim etničkim grupama (136).

U našem istraživanju, polimorfizmi +46A>G (Arg16Gly) i +79C>G (Gln27Glu) prvi put su ispitivani u populaciji srpske dece . Alel +46A je detektovan sa učestalošću od 41,7%, dok je alel +79G otkriven sa učestalošću od 23,1% što je u skladu sa objavljenim podacima kod dece bele rase (137). Raspodela posmatranih genotipova za +46A> G i +79C> G polimorfizama bila su u skladu sa ravnotežom *Hardi-Weinberg* ($p = 0.050$ i $p = 0.359$, respektivno). U ispitivanom uzorku dece sa astmom frekvencija genotipova za polimorfizam + 46G>A (Arg16Gly) u ADRB2 genu je iznosila 24,1% za AA, 35,2% za AG i 40,7% za GG dok je frekvencija genotipova za polimorfizam + 79C>G (Gln27Glu) iznosila 63,0% za CC 27,8% za CG i 9,2% za GG. Ovi rezultati nisu pokazali statistički značajnu razliku u distribuciji genotipova za polimorfizam +46G>A između dece sa astmom i kontrolne grupe zdravih odraslih osoba. Uočena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova u polimorfizmu +79C>G jer je genotip +79CC bio značajno zastupljeniji u grupi dece sa astmom. Naši rezultati su u kontradiktornosti sa rezultatima studija kod Japanaca, Indijaca, Afroamerikanaca, ali su potvrdili rezultate istraživanja kod Britanaca, Kineza, kao i kod dece u Italiji (137–142). Diskrepanca u rezultatima genetičkih analiza može biti rezultat rasnih različitosti (143). Ove razlike odražavaju potrebu za širokim populacionim studijama.

Dosadašnja istraživanja povezanosti polimorfizama u genu ADRB2 kod dece sa astmom sa bronhodilatatornim odgovorom na inhalirane kratkodelujuće beta-2 agoniste pokazala su kontradiktorne rezultate saopštene u literaturi.

U našoj studiji, prisustvo alela +46G u ADRB2 genu je povezano sa boljim bronhodilatatornim odgovorom na inhalacionu primenu kratkodelujućeg beta-2 agonista (salbutamol). Rezultate slične našim prikazali su autori u ranim studijama čiji rezultati su pokazali bolji bronhodilatatorni odgovor kod dece sa genotipom +46GG (126). Slični rezultati objavljeni su i nešto kasnije (119, 120, 144–147). U ranoj studiji *Israel-a* i

saradnika bilo je uključeno 190 odaslih ispitanika sa blagom astmom koji su inhalirani kratkodelujućim beta-2 agonistom. Rezultati ispitivanja su pokazali da su ispitanici sa genotipom +46GG imali bolju vrednost vršnog ekspirijumskog protoka u odnosu na ispitanike sa genotipom +46AA koji su doživeli pad jutarnjih vrednosti vršnog ekspirijumskog protoka (119). Posle ovih rezultata *Taylor* i saradnici publikovali su studiju u kojoj su prikazali rezultate koji su ukazali na češća pogoršanja astme kod ispitanika sa genotipom +46AA kod kojih su koristili uobičajene doze kratkodelujućeg beta-2 adrenergičkog receptora, a u skladu sa terapijskim preporukama (120).

Israel sa saradnicima je zatim sproveo prospektivno, randomizovano, dvostruko slepo, placebo kontrolisano, genotipski stratifikovano ispitivanje dejstva kratkodelujućeg inhalacionog agonista beta-2 adrenergičkog receptora u poređenju sa placebom u redovnoj terapiji odraslih sa astmom. Oboleli od astme sa genotipom +46GG imali su bolje vrednosti izmerenih plućnih funkcija u jutarnjim satima posle primene salbutamola u odnosu na ispitanike sa +46 AA genotipom (148). Ovakve rezultate je *Palmer* praktično duplirao u studiji u koju je bilo uključeno 546 dece sa astmom (149).

Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa nalazima *Carroll*-a i saradnika koji su u studiji sprovedenoj kod dece sa astmom u pogoršanju pokazali da je + 46GG genotip povezan sa boljim bronhodilatatornim odgovorom na kratkodelujući agonist ADRB2 (deca su primala pojedinačne ponavljane preporučene doze nebulizovanog salbutamola ili kontinuirano u toku jednog sata) (150). Ovde se mora uzeti u obzir mogućnost da je tahifilaksa na terapiju ADRB2 agonistom doprinela smanjenom odgovoru na terapiju kod dece sa astmom koji su nosioci drugih genotipova. Ovim su se bavile i studije kod odraslih kao što je studija *Telleria*-e sa saradnicima i *Lee*-a sa saradnicima, koje su pokazale da su nosioci +46A alela u ADRB2 genu imali povećanu tahifilaksu na terapiju agonistima beta-2 adrenergičnih receptora (151, 152).

Postoje publikovane studije koje pokazuju suprotne rezultate od rezultata našeg istraživanja. Rana studija *Martinez*a i saradnika pokazala je da su deca sa astmom i +46AA genotipom imala značajno bolji bronhodilatatorni odgovor na primenjen nebulizovani salbutamol u odnosu na decu sa +46GG genotipom ($p=0,05$) (153). Nešto kasnije, slične rezultate objavili su autori iz Japana koji su ispitivali 117 osoba sa

astmom. Ti rezultati su pokazali da su oboleli od astme koji su homozigoti za Gly pokazali značajno niži bronhodilatatorni odgovor disajnih puteva posle inhalacije salbutamola od onih koji su heterozigoti za Arg/Gly ili homozigoti za Arg. Oboleli od astme sa genotipom +46GG su imali znatno raniju pojavu astme (154).

Studija Lime i saradnika je pokazala slične rezultate. Ova studija je pokazala da je FEV1 bio veći i bronhodilatatorni odgovor je bio bolji kod homozigota Arg 16 u poređenju sa grupom ispitanika koji su bili nosioci Gly16 varijante i maksimalni procentualni porast FEV1 (dFEV1) je bio 18% naspram 4,9% ($p < 0,05$) (155). Ovakvi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima naše studije jer je maksimalni procentualni porast FEV1 (dFEV1) posle primene nebulizovanog salbutamola zabeležen kod genotipa + 46 GG i iznosio je 14,4% ($p < 0,05$).

Rezultati metaanalize *Finkelstin*-a i saradnika koja se bavila ispitivanjem povezanosti između ADRB2 polimorfizama kod dece sa astmom i odgovora na inhalirani beta-2 agonist, pokazali su značajnu povezanost između povoljnog terapijskog odgovora na inhalirani beta-2 agonist i genotip +46AA (113). U studiji iz 2012. godine kod dece sa astmom u Egiptu, +46G alel (AG i GG genotipovi) bio je povezan sa lošijim bronhodilatatornim odgovorom na inhalirani kratkodelujući beta-2 agonist (salbutamol) u poređenju sa +46AA genotipom (156). Rezultati nešto ranije urađene studije kod odraslih sa astmom pokazali su drugačije nalaze, naime bolji bronhodilatatorni odgovor na salbutamol su pokazali nosioci GG genotipa.

Jedina do sada sprovedena i objavljena studija u Srbiji bila je kod 171 odrasle osobe sa astmom i pokazala je bolji bronhodilatatorni odgovor kod astmatičara nosilaca alela + 79C (126). Ovde se mora uzeti u obzir da je u fokusu ispitivanja bio i LABA, a ne samo SABA.

In vitro funkcionalne studije pokazale su da kod osoba koje su nosioci Gly16 alela dolazi do „down“ regulacije ADRB 2 receptora u odgovoru na cirkulišuće e kateholamine ili egzogeno primenjene beta-2 agoniste. Arg16 alel, koji pokazuje otpornost prema „down“ regulaciji, možda stoga se izražava na višim nivoima od Gly16 alela unutar disajnih puteva. Prema tome, pojedinci koji nose Gly/Gly genotip mogu biti osetljiviji na stimulse koji rezultiraju bronhokonstrikcijom i zbog toga mogu da imaju

reaktivnije disajne puteve na dejsvo beta-2 agonista od pojedinaca koji nose Arg16 alel (121, 157).

Produžena primena ADRB2 agonista dovodi do tolerancije receptora zbog gubitka signala transdukcije i/ili njihove desenzitizacije. Proces starenja utiče na odgovor na ADRB2 agoniste i druge bronhodilatatore i takođe klinički je značajan kod astme (158). Smanjenje reaktivnosti na SABA (salbutamol) povezano je sa životnim dobom i izraženije je kod starije populacije (159, 160).

Metaanaliza kod dece iz 2016. godine, kod 4 226 dece iz Severne Evrope i Latinske Amerike ispitivala je povezanost prisustva alela A (Arg16 amino kiselina) i egzacerbaciju astme kod dece. Rezultati su pokazali da nosioci genotipa AA imaju veći rizik za akutno pogoršanje astme. U fokusu ove studije je bila primena LABA sa prisustvom AA genotipa i pojavom pogoršanja bolesti. Autori, ipak, nisu isključili mogućnost da postoji mala aditivna veza između SABA i LABA za pogoršanje bolesti (161). Veza između LABA , SABA i pogoršanja astme uvek će biti izazov za proučavanje, jer je česta primena SABA indikacija za terapiju LABA. Međutim, rezultati ove metastudije kod dece ukazuju na veći uticaj primene LABA nego kratkodelujućeg beta-2 agonista, što možda nije iznenađujuće s obzirom na potencijalni efekat od dužeg uticaja na receptor od strane dugodelujućeg beta-2 agonista u odnosu na SABA, posebno kod genetski „osetljivih“ osoba. Potrebne su i studije posebno dizajnirane tako da istraže očiglednu neusklađenost posmatranja kod odraslih i dece, jer su razlike u bronhodilatatornom odgovoru dece i odraslih na beta-2 agonist dobro prepoznate u dosadašnjim istraživanjima (162, 163).

Međutim, neke veće studije su pokazale odsustvo povezanosti genetske varijacije ADRB2 i bronhodilatatornog odgovora na inhalirani beta-2 agonist (164–168). Nasuprot prethodnim rezultatima o povezanosti varijante +46A>G i osobina koje se odnose na bronhodilatatore, studija sprovedena kod 376 Afroamerikanaca sa astmom pokazala je da polimorfizam Arg19Cis u ADRB2 genu može igrati važnu ulogu u terapijskom efektu bronhodilatacionih lekova kod afroameričkih ispitanika (164). Velika studija sprovedena kod Han populacije u Kini takođe nije pokazala značajnu povezanost ispitivanih polimorfizama Arg16Gly i Gln27Glu sa bronhodilatatornim

odgovorom na kratkodjelujući beta-2 agonist. Isti rezultati su publikovani i u studijama kod dece u Poljskoj i Kolumbiji (166, 168).

Studija iz 2016. godine kod 120 dece uzrasta od 5 do 15 godina sa astmom u Indiji prikazala je rezultate u kojima nije pronađena značajna povezanost između genotipova ADRB2 i odgovora na salbutamol ($P = 0,55$). Međutim, kod onih koji su nosili AA u poređenju sa GG homozigotima, primećen je trend povećanja bronhodilatatornog odgovora. Prosečna vrednost procentualne promene u predviđenom FEV1 u tri genotipa ADRB2 bila je 14,5 za AA, 12,5 za GA i 7,7 za genotip GG, redom (132). Za razliku od ovih rezultata koje su Indijci prikazali, vrednosti procentualne promene FEV1 posle primene nebulizovanog salbutamola u našoj studiji za ova tri genotipa su bile 9,4 za AA, 10,4 za GA i 14,4 za GG sa statistički značajno boljim bronhodilatatornim odgovorom za GG ($p = 0,044$).

Što se tiče uticaja polimorfizama na težinu astme, rezultati naše studije su pokazali postojanje povezanosti alela +46G u ADRB2 genu sa blagim oblikom astme. Ovakav nalaz da nosioci +46G alela imaju tendenciju da razviju blagi oblik astme u korelaciji je sa nalazima drugih studija koje su do sada publikovane. U metaanalizi 28 studija, autori su zaključili da nosioci genotipa +46AA imaju veći rizik od razvoja teške i noćne astme nego nosioci genotipa +46GG. Nije pronađena takva povezanost kod ispitanika koji su nosioci alela +79C (112). Autori iz Italije su 2016. godine prikazali rezultate studije kod odraslih kojima su pokazali povezanost prisustva genotipa +46AA sa teškom astmom (169).

U egipatskoj studiji kod dece iz 2012. godine dobijeni nalazi su pokazali povezanost AA genotipa sa blagom astmom u poređenju sa umerenom i teškom astmom (156). S druge strane, GG genotip je povezan sa umerenom i teškom astmom u poređenju sa blagom astmom. Ovo ukazuje na to da je polimorfizam u kodonu 16 ADRB2 gena moguća determinanta težine astme kod dece u Egiptu. Studija kod dece iz 2012. godine u kojoj su autori ispitivali povezanost polimorfizama u ADRB2 genu sa pogoršanjem astme i potrebom za mehaničkom ventilacijom pokazala je da deca sa genotipom +46AG i +79CC imaju veću verovatnoću da zbog pogoršanja bolesti budu intubirana i mehanički ventilirana ($OR=4,2$; $95\% CI=1,2-14,5$; $p = 0,036$) nego deca sa drugim genotipovima. Zaključeno je da deca koja su nosioci ovih genotipova imaju

četiri puta veću verovatnoću za intubaciju i mehaničku ventilaciju tokom teških pogoršanja astme što ukazuje na činjenicu da genetski faktori mogu uticati na razvoj fenotipa teške astme tokom akutnog pogoršanja (170).

Kao što je prethodno navedeno, rezultati naše studije kod dece sa astmom u Srbiji pokazali su povezanost genotipa +46GG sa fenotipom blage astme. Međutim, primećeno je u podgrupi astmatične dece sa +46A>G polimorfizmom, da najveći procenat dece sa teškom astmom su nosioci +46GG genotipa. Budući da je ovaj genotip povezan sa najboljim odgovorima na salbutamol, možemo očekivati dobar klinički odgovor na salbutamol u podgrupi dece koja imaju fenotip teške astme i nosioci su +46GG genotipa.

U do sada publikovanim rezultatima uočavaju se razlike u uticaju ispitivanih polimorfizama u ADRB2 genu na težinu astme, kao i terapijski efekat primenjenih lekova u različitim etničkim grupama. Tako je *Choudhari* sa saradnicima ispitivao etničke razlike i pokazao bolji odgovor salbutamola kod dece meksičke populacije, ali ne i portorikanske populacije, sa +46AA genotipom (171).

Prema podacima do sada učinjenih istraživanja, nije postignut konsenzus o odnosu poznatih varijanti u ADRB2 genu i astme. Aleli zajednički za različite etničke grupe mogu da imaju različit značaj zbog uticaja i interakcije sa faktorima sredine ili drugim genetskim varijantama specifičnim za određenu etničku grupu. Interpretacija nalaza je dodatno otežana neadekvatnom procenom uticaja sredine, razlikama u rasprostranjenosti alela i njihovih kombinacija u različitim populacijama. Neki od razloga koji mogu objasniti nesklad u rezultatima koje prijavljuju različiti autori, jesu da studije nisu bile koherentne u smislu starosti ispitanika i težine njihove bolesti. Autori su takođe koristili različite beta-2 agoniste i različite karakteristike koje su pratili kako bi procenili bronhodilatatorni odgovor na lekove. Različiti autori su proučavali udruženost određenih haplotipova sa terapijskim odgovorom na određeni lek i zaključili da se različiti rezultati mogu objasniti specifičnim kombinacijama polimorfizama koje se najčešće nasleđuju zajedno, a ne pojedinačnim polimorfizmima.

Ovo ispitivanje ima određena ograničenja, kao što je relativno mali broj ispitanika, analizirana su samo dva polimorfizma, nisu mogli biti razmatrani uticaji

faktora spoljašnje sredine, nedostatak prilagođene kontrolne grupe. S druge strane, primenili smo stroge kriterijume za odabir dece sa astmom kako bi izbegli mogućnost uticaja negenetičkih faktora na dobijene rezultate. Deca sa astmom koja imaju druge pridružene bolesti nisu bila uključena u ispitivanje. Ispitivanje je obuhvatilo upotrebu kratkododelujućeg bronhodilatatora i rezultati se ne mogu tumačiti u svetlu efekata njihove dugotrajne upotrebe ili, eventualno, efekata dugodelujućih bronhodilatatora. Zbog kliničkog značaja ispitivanja efikasnosti ADRB2 agonista u terapiji astme u odnosu na životnu dob i ADRB2 genotip, potrebno je u ispitivanje uključiti veći broj dece. Procena odgovora na terapiju ADRB2 agonista sa starenjem zahteva duži period praćenja i postojanje većeg broja pacijenata i definisanih uzrasnih grupa. Ispitivanje je obuhvatilo decu srpske nacionalnosti, iako u Srbiji postoje pripadnici drugih etničkih zajednica (npr. mađarske, hrvatske, romske i dr.).

Ne možemo isključiti mogućnost da druge varijante u kodirajućem ili regulatornim regionima gena ADRB 2 mogu doprineti rezultatima . Činjenica je da postoji mnoštvo polimorfizama ADRB 2 gena, a verovatnije je da će određeni set alela biti nasleđeni zajedno kao blok. Zaštitni efekat jednog polimorfizma može smanjiti neželjeni efekat drugog polimorfizma kada se naslede zajedno. Stoga, asocijacija haplotipova ADRB2 sa odgovorom bronhodilatatora može biti relevantnija od pojedinačnih polimorfizama. Za ekstrapolaciju ovih rezultata u našoj populaciji potreban je veći uzorak i treba uzeti u obzir etničku pripadnost.

Ovo je drugi put da se objavljuju podaci o frekvenciji polimorfizama + 46A>G (Gly16Arg) i + 79C>G (Gln27Glu) u našoj populaciji, a prvi put među decom obolelom od bronhijalne astme. Ova saznanja bi u budućnosti potencijalno mogla doprineti razvoju personalizovane terapije astme (172–176). Zajednička karakteristika dosadašnjih populacionih ispitivanja genoma jeste nedostatak adekvatno reprezentovanih grupa ispitanika, zbog toga što se neke populacijske grupe mnogo češće javljaju u pojedinim oboljenjima (gde je genetska struktura faktor rizika za ispoljavanje bolesti), ali i zbog nemedicinskih aspekata kao što su stepen razvijenosti zdravstvene i socijalne zaštite gde određene grupe nemaju pristup medicinskoj zaštiti, a pogotovo kliničkim ispitivanjima (177). Takođe, kada se radi o ispitivanjima kod dece i etičke dileme mogu da predstavljaju ograničenje u kreiranju istraživanja. Nije bez značaja ni

problem finansiranja istraživanja koje bi obuhvatilo dovoljan broj ispitanika. Dodatni problem u multikulturalnim sredinama je sve učestalije mešovito etničko poreklo pojedinaca koji ulaze u ovakva ispitivanja (178).

Mogući doprinos uvođenja metoda genetske analize ADRB2 polimorfizma u širu kliničku primenu u pedijatrijskoj populaciji, jeste činjenica da određen broj dece u opštoj populaciji, kao i u populaciji dece sa astmom, može imati pridružene bolesti i stanja koja zahtevaju dugogodišnju upotrebu lekova koji deluju na nivou beta adrenergičkih receptora, što bi omogućilo da se predvidi na koji način treba modulirati terapiju s ciljem efikasnijeg lečenja i unapređenja kvaliteta života ove dece, ali i njihovih roditelja. Na taj način bi u budućnosti, na osnovu dobijenih rezultata, mogli da predvidimo tok bolesti i odgovor na terapiju u zavisnosti od prisustva određenih genetičkih markera.

Pored toga što postoji i dalje veliki broj prepreka za uvođenje personalizovane terapije astme (neophodno je postojanje elektronskih baza podataka, formiranje nacionalnih smernica za terapiju) i da će verovatno u bliskoj budućnosti biti otkriven još veći broj gena označenih kao faktori rizika za pojavu astme i/ili modulatori terapijskog odgovora, kada genetski testovi za predviđanje terapijskog efekta postanu deo svakodnevnih kliničkih prakse, najveći interes će imati deca sa fenotipovima teške astme.

Na kraju, cilj istraživača je usmeren ka pronalaženju načina da se sprovede personalizovani pristup terapiji prilagođen svakom detetu sa astmom. Na kliničkim lekarima je obaveza da uz pomoć postojećih smernica za lečenje oblikuju terapiju koja je najbolja za svako dete ponaosob.

6. ZAKLJUČCI

- U ispitivanom uzorku dece sa astmom u Srbiji prisustvo promena u ADRB2 genu je analizirano direktnim sekvenciranjem DNK. Utvrđeno je prisustvo polimorfizama +46A>G (Arg16Gly, rs1042713) i +79C>G (Gln27Glu, rs1042714).
- Kod dece sa astmom najučestalija kombinacija alela za polimorfizam +46A>G (Arg16Gly) je bila GG (Gly16Gly).
- Kod dece sa astmom najučestalija kombinacija alela za polimorfizam +79C>G (Gln27Glu) je bila CC (Gln27Gln).
- Razlika učestalosti kombinacija alela za polimorfizam +46A>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom i kontrolne grupe zdravih osoba nije statistički značajna.
- Statistički je značajna razlika u učestalosti genotipova za polimorfizam +79C>G u ADRB2 genu kod dece sa astmom i u kontrolnoj grupi zdravih osoba. Genotip +79GG (Glu27Glu) je češće pristan u kontrolnoj grupi zdravih osoba.
- Uočena je statistički značajna razlika u učestalosti blage, umerene i teške astme između nosilaca različitih genotipova polimorfizma +46A>G u grupi dece sa astmom. Značajno češće se javlja umerena astma kod dece sa genotipom +46AA (Arg16Arg).
- Razlika učestalosti tipova astme prema težini između različitih genotipova polimorfizma +79C>G kod dece sa astmom nije statistički značajna.
- Statistički je značajna razlika u bronhodilatatornom odgovoru kod dece sa astmom u odnosu na genotipske varijante +46A>G. Najbolji odgovor su imali nosioci +46GG genotipa.
- Razlika u bronhodilatatornom odgovoru kod dece sa astmom u odnosu na genotipske varijante +79C>G nije statistički značajna.

- Deca sa pozitivnom porodičnom anamnezom imaju, visoko statistički značajno češće težak oblik astme u odnosu na decu sa astmom koja nemaju pozitivnu porodičnu anamnezu.
- Razlika u učestalosti tipova astme prema težini u odnosu na izloženost duvanskom dimu *in utero* nije statistički značajna.
- Razlika u učestalosti polimorfizama +46A>G i +79C>G kod dece sa astmom u odnosu na prosečnu vrednost ukupnog IgE iz seruma, prosečnu vrednost eozinofila iz periferne krvi, kao i prisustvo atopijskog dermatitisa nije statistički značajna.

7. LITERATURA

1. Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OC, Sheikh A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy*. 2010; 65: 152–167.
2. Bisgaard H, Szeftler S. Prevalence of asthma-like symptoms in young children. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:723–8.
3. Asher I, Pearce N. Global burden of asthma among children. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014; 18: 1269-78. *Pulmonol* 2007;42:723–8.
4. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998;12:315–35.
5. Živković Z. Učestalost astme, rinitisa i ekcema kod dece u Beogradu i Srbiji. *Dečija pulmologija* 2002; 10: 27–43.
6. Lemanske RF Jr, Busse WW. Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:502–19.
7. Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;105:466–72
8. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2016. Available from: www.ginasthma.org.
9. Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, Abecasis G, Broxholme J, Ponting CP, et al. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet* 2003;35:258–63.
10. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002;418:426–30.
11. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Salmikangas J, Mäkelä S, et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* 2004;304:300–4.
12. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:976–83.
13. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259–60.

14. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994;264:1152-6.
15. Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WO, Hopkin JM. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* 1994;7:125-9.
16. Cookson W. A new gene for asthma. Would you ADAM and Eve it? *Trends in Genet* 2003;19:169-72.
17. Toelle BG, Peat JK, Salome CM, Mellis CM, Woolcock AJ. Toward a definition of asthma for epidemiology. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:633-7.
18. Weiss ST, Speizer FE. Epidemiology and natural history. In: *Bronchial Asthma Mechanisms and Therapeutics*, izd. 3, Weiss EB, Stein M (Eds), Boston, Little, Brown, 1993, str. 15.
19. Weiss ST, Gold DR. Gender differences in asthma. *Pediatr Pulmonol* 1995;19:153-5.
20. Sennhauser FH, Kühni CE. Prevalence of respiratory symptoms in Swiss children: is bronchial asthma really more prevalent in boys? *Pediatr Pulmonol* 1995;19:161-6.
21. National Asthma Education and Prevention Program: Expert panel report II: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute (NIH publication no. 97-4051), Bethesda, MD 1997.
22. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* 1999;54:268-72.
23. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood: a prospective study. *N Eng J Med* 1990;323:502-7.

24. Gold DR. Environmental tobacco smoke, indoor allergens and childhood asthma. *Environ Health Perspect* 2000;108:643–51.
25. Platts-Mills TA. How environment affects patients with allergic disease: indoor allergens and asthma. *Ann Allergy* 1994;72:381–4.
26. Kerkhof M, Wijga AH, Brunekreef B, Smit HA, de Jongste JC, Aalberse RC, Hoekstra MO, Gerritsen J, Postma DS. Effects of pets on asthma development up to 8 years of age: the PIAMA study. *Allergy* 2009;64:1202–8.
27. Carlsten C, Brauer M, Dimich-Ward H, Dybuncio A, Becker AB, Chan-Yeung M. Combined exposure to dog and indoor pollution: incident asthma in a high-risk birth cohort. *Eur Respir J* 2011;37:324–30.
28. D'amato G, Spiekma FT, Liccardi G, Jager S, Russo M, Kontou-Filli K, et al. Pollenrelated allergy in Europe. *Allergy* 1998;53:567–78.
29. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1501–7.
30. Gern JE, Busse WW. Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nat Rev Immunol* 2002;2:132–8.
31. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541–5.
32. Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996;347:1792–6.
33. Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U, MAS Group. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001;322:390–5.

34. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000;343:538–43.
35. de Meer G, Janssen NA, Brunekreef B. Early childhood environment related to microbial exposure and the occurrence of atopic disease at school age. *Allergy* 2005;60:619–25.
36. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, I sur. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. ALEX Study Team. *Lancet* 2001;358:1129–33.
37. Vercelli D. Learning from discrepancies: CD14 polymorphisms, atopy and the endotoxin switch. *Clin Exp Allergy* 2003;33:153–5.
38. Semić-Jusufagić A, Simpson A, Čustović A. Environmental exposures, genetic predisposition and allergic diseases: one size never fits all. *Allergy* 2006;61:397–9.
39. Larché M, Robinson D, Kay B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:450–63.
40. Ford ES. The epidemiology of obesity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:897–909.
41. Beuther DA, Sutherland ER. Overweight, obesity, and incident asthma: a meta-analysis of prospective epidemiologic studies. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:661–6.
42. Shore SA, Fredberg JJ. Obesity, smooth muscle, and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:925–7.
43. Chen Y, Dales R, Jiang Y. The association between obesity and asthma is stronger in nonallergic than allergic adults. *Chest* 2006;130:890.
44. Taylor B, Mannino D, Brown C, Crocker D, Twum-Baah N, Holguin F. Body mass index and asthma severity in the National Asthma Survey. *Thorax* 2008;63:14–20.

45. Stenius-Aarniala B, Poussa T, Kvarnström J, Grönlund EL, Ylikahri M, Mustajoki P. Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomised controlled study. *BMJ* 2000;320:827.
46. Wang L, Pinkerton KE. Detrimental effects of tobacco smoke exposure during development on postnatal lung function and asthma. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008;84:54–60.
47. Cohen RT, Raby BA, Van Steen K, Fuhlbrigge AL, Celedón JC, Rosner BA, Strunk RC, Zeiger RS, Weiss ST; Childhood Asthma Management Program Research Group. In utero smoke exposure and impaired response to inhaled corticosteroids in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:491–7.
48. Evans D, Levison MJ, Feldman CH, Clark NM, Wasilewski Y, Levin B, Mellins RB. The impact of passive smoking on emergency room visits of urban children with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:567–72.
49. Weitzman M, Gortmaker S, Walker DK, Sobol A. Maternal smoking and childhood asthma. *Pediatrics* 1990;85:505–11.
50. Halcken S Early sensitisation and development of allergic airway disease - risk factors and predictors. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:128–34.
51. Jaakkola JJ, Ahmed P, Ieromnimon A, Goepfert P, Laiou E, Quansah R, Jaakkola MS. Preterm delivery and asthma: a systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:823–30.
52. Tollånes MC, Moster D, Daltveit AK, Irgens LM. Cesarean section and risk of severe childhood asthma: a population-based cohort study. *J Pediatr* 2008;153:112.
53. Chatzi L, Torrent M, Romieu I, Garcia-Esteban R, Ferrer C, Vioque J, Kogevinas M, Sunyer J. Mediterranean diet in pregnancy is protective for wheeze and atopy in childhood. *Thorax* 2008;63:507.
54. Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, Helms PJ, Seaton A, Weiss ST. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. *Am J Clin Nutr* 2007;85:853.

55. Litonjua AA, Rifas-Shiman SL, Ly NP, Tantisira KG, Rich-Edwards JW, Camargo CA Jr, Weiss ST, Gillman MW, Gold DR. Maternal antioxidant intake in pregnancy and wheezing illnesses in children at 2 y of age. *Am J Clin Nutr* 2006;84:903.
56. Devereux G, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, Harbour PJ, Helms PJ, Seaton A. Low maternal vitamin E intake during pregnancy is associated with asthma in 5-year-old children. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:499.
57. Martinez FD, Wright AL, Holberg CJ, Morgan WJ, Taussig LM. Maternal age as a risk factor for wheezing lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1992;136:1258.
58. Von Mutius E. Neonatal jaundice is a risk factor for childhood asthma: a retrospective cohort study. Ku MS, Sun HL, Sheu JN, Lee HS, Yang SF, Lue KH. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:623–8.
59. Kull I, Melen E, Alm J, Hallberg J, Svartengren M, van Hage M, Pershagen G, Wickman M, Bergström A. Breast-feeding in relation to asthma, lung function, and sensitization in young schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:1013–9.
60. von Berg A, Koletzko S, Filipiak-Pittroff B, Laubereau B, Grübl A, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; German Infant Nutritional Intervention Study Group. Certain hydrolyzed formulas reduce the incidence of atopic dermatitis but not that of asthma: three year results of the German Infant Nutritional Intervention Study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:718–25.
61. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:9–19.
62. Woodcock A, Čustović A. Role of the indoor environment in determining the severity of asthma. *Thorax* 1998;53:47–51.
63. Jones AP. Asthma and the home environment. *J Asthma* 2000;37:103–24.
64. Bousquet J, Jefery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. State of the art. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720–45.

65. Holt PG. The role of airway dendritic cell populations in regulation of Tcell responses to inhaled antigens: Atopic asthma as paradigm. *J Aerosol Med* 2004;15; 161–8.
66. Brown RH, Pearse DB, Pyrgos G, Liu MC, Togias A, Permutt S. The structural basis of airways hyperresponsiveness in asthma. *J Appl Physiol* 2006;101:30.
67. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M i sur. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008;63:5–34.
68. King CS, Moores LK. Clinical Asthma Syndromes and Important Asthma Mimics *Respir Care* 2008;53:568–80.
69. Gold MS, Kemp AS. Atopic disease in childhood. *Med J Aust* 2005;182:298–304.
70. Killian KJ, Watson R, Otis J, St Amand TA, O’Byrne PM. Symptom perception during acute bronchoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:490–6.
71. Wood RA. Skin testing: making the most of every prick. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;88:347–9.
72. Spahn JD, Chipps BE. Office-based objective measures in childhood asthma. *J Pediatr* 2006;148:11–15.
73. Nair SJ, Daigle KL, DeCuir P, Lapin CD, Schramm CM. The influence of pulmonary function testing on the management of asthma in children. *J Pediatr* 2005;147:797–801.
74. Strunk RC, Szeffler SJ, Philips BR, i sur. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:883–92.
75. Lemaske RF Jr, Green CG. Asthma in infancy and childhood. U Middleton E, Jr, Reed CE, Ellis EF, i sur. Izdavači: Allergy: principles and practice, izd. 5, St. Louis 1998, Mosby, str. 877.

- 76 . Saglani S, Nicholson AG, Scallan M, Balfour-Lynn I, Rosenthal M, Payne DN et al. Investigation of young children with severe recurrent wheeze: any clinical benefit? *Eur Respir J* 2006;27:29–35.
77. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, Lemanske RF Jr, Wardlaw AJ, Wenzel SE, Greenberger PA. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:355–60.
78. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, et al. International ERS/ATS Guidelines on Definition, Evaluation and Treatment of Severe Asthma. *Eur Respir J* 2014;43:343–73.
79. Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, et al; American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Asthma Control and Exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180: 59–99.
80. Fuhlbrigge AL, Kitch BT, Paltiel AD, Kuntz KM, Neumann PJ, Dockery DW, Weiss ST. FEV1 is associated with risk of asthma attacks in a pediatric population. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:61–7.
81. Siroux V, Oryszczyn MP, Paty E, Kauffmann F, Pison C, Vervloet D, Pin I. Relationship of allergic sensitization, total immunoglobulin E and blood eosinophils to asthma severity in children of the EGEA Study. *Clin Exp Allergy* 2003;33:746–51.
82. Maneechotesuwan K, Sujaritwongsanon P, Suthamsmai T. IgE production in allergic asthmatic patients with different asthma control status. *J Med Assoc Thai* 2010;93:71–8.
83. Liu AH, Zeiger RS, Welch M, et al. Development and validation of a patient- based measure of asthma control in children (Childhood ACT). Presented at the Annual Meeting of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology (ACAAI), Anaheim, California, 4–9 November 2005. Abstract no. 35.

84. Juniper EF, Thompson AK, Ferrie PJ, Roberts JN. Development and validation of the mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *Clin Exp Allergy* 2000;30:132–40.
85. Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, Custovic A, Gern J, Lemanske R, et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma. *Allergy* 2012;67:976–97.
86. Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N Engl J Med* 1995;332:868–75.
87. Lipworth BJ. Leukotriene-receptor antagonists. *Lancet* 1999;353:57–62.
88. Drazen JM, Israel E, O’Byrne PM. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med* 1999;340:197–206.
89. Woolcock A, Lundback B, Ringdal N, Jacques LA. Comparison of addition of salmeterol to inhaled steroids with doubling of the dose of inhaled steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1481–8.
90. Ducharme FM, Ni Chroinin M, Greenstone I, Lasserson TJ. Addition of long-acting beta2-agonists to inhaled steroids versus higher dose inhaled steroids in adults and children with persistent asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD005533.
91. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:558–62.
92. Cazzola M, Page CP, Rogliani P, Matera MG. β 2-agonist therapy in lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:690.
93. Beardshaw J, MacLean L, and Chan-Yeung M. Comparison of the bronchodilator and cardiac effects of hydroxyphenyl orciprenaline and orciprenaline. *Chest* 1974; 65:507–511.
94. Corris PA, Neville E, Nariman S, and Gibson GJ. Dose-response study of inhaled salbutamol powder in chronic airflow obstruction. *Thorax* 1983;38:292–296.
95. Johnson, M. *Am. Thoracic Soc.* 1998;158: 146–53.

96. Price AH, Clissold SP. Salbutamol in the 1980s. A reappraisal of its clinical efficacy. *Drugs* 1989;38:77–122.
97. Sears MR and Lötvall J. Past, present and future— β 2-adrenoceptor agonists in asthma management. *Respir Med* 2005; 99: 152–170.
98. Baren JM, Zorc JJ. Contemporary approach to the emergency department management of pediatric asthma. *Emerg Med Clin North Am.* 2002; 20: 115–138.
99. Kobilka, B.K., Dixon, R.A., Frielle, H.G., Dohlman, M.A., Bolanowski, I., and Sigal, I.S. cDNA for the human β 2 adrenergic receptor: a protein with multiple spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of a receptor for platelet growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 46–50.
100. Liggett, S.B. Update on current concepts of the molecular basis of β 2-adrenergic receptor signalling. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110: S223–S228.
101. Hayes, M.J., Qing, F., Rhodes, C.G., Rahman, S.U., Ind, P.W., Sriskanden, S. et al. In vivo quantification of human pulmonary β -adrenoceptors: effect of β -agonist therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 1277–1283
102. Qing, F., Rahman, S.U., Rhodes, C.G., Hayes, M., Ind, P.W., and Hughes, J.M. β -adrenergic receptors in vivo and lung function in drug-free asthmatic subjects. ([abstract]) (A885)*Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155.
103. Kubota, T., Koga, K., Araki, H., Odajima, H., Nishima, S., Miyamoto, H. et al. The relationships of mononuclear leukocyte β -adrenergic receptors to aerobic capacity and exercise-induced asthma in asthmatic children. *Arerugi.* 2000; 49: 40–51.
104. Robison, G.A., Butcher, R.W., and Sutherland, E.W. Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 1967; 319: 703–723.
105. Johnson, M. and Coleman, R.A. Mechanisms of action of β 2-adrenoceptor agonists. in: W.W. Busse, S.T. Holgate (Eds.) *Asthma & rhinitis.* Blackwell, Cambridge; 1995: 1278–1295.

106. Daaka, Y., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. Switching of the coupling of the adrenergic receptor to different G-proteins by protein kinase A. *Nature*. 1997; 390: 88–91.
107. Johnson, M. Combination therapy for asthma: complementary effects of long-acting β 2-agonists and corticosteroids. *Curr Allergy Clin Immunol*. 2002; 15: 16–22.
108. Johnson, M. Mechanisms of action of β 2-adrenoceptor agonists. in: W.W. Busse, S.T. Holgate (Eds.) *Asthma & rhinitis 2*. Blackwell, Cambridge; 2000: 1541–1557.
109. Johnson, M. The β -adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158: 146–153.
110. Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β 2-adrenergic receptor and β -arrestin. *Science*. 2001; 294: 1307–1313.
111. Reishaus, E., Innis, M., MacIntyre, N., and Liggett, S.B. Mutations in the gene encoding for the β 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993; 8: 334–339.
112. Contopoulos-Ioannidis DG, Manoli EN, Ioannidis JP. Meta-analysis of the association of β 2-adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 963–972.
113. Finkelstein Y, Bournissen FG, Hutson JR, Shannon M. Polymorphism of the ADRB2 gene and response to inhaled beta-agonists in children with asthma: a meta-analysis. *J Asthma*. 2009; 46: 900–5.
114. Holroyd, K.J., Levitt, R.C., Dragwa, C., Amelung, P.J., Panhuysen, C.M., and Meyers, D.A. Evidence for β 2-adrenergic receptor polymorphism at amino acid 16 as a risk factor for bronchial hyper-responsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151.
115. Hall, I.P. β 2-Adrenoceptor polymorphisms: are they clinically important?. *Thorax*. 1996; 51: 351–353.

116. Rahman, S.U., Qing, F., Rhodes, C.G., Hall, I.P., Ind, P.W., Jones, T. et al. Regulation of pulmonary β 2-adrenergic receptor expression: concordance between receptor density, function and genotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155.
117. Martinez, F.D., Graves, P.E., Baldini, M., Soloman, S., and Erickson, R. Association between genetic polymorphisms of the β 2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest.* 1997; 100: 3184–3188.
118. Tan, S., Hall, I.P., Dewar, J., Dow, E., and Lipworth, B. Association between β 2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. *Lancet.* 1997; 350: 995–999.
119. Israel, E., Drazen, J.M., Liggett, S.B., Boushey, H.A., Cherniak, R.M., Chinchilli, V.M. et al. The effect of polymorphisms of the β 2-adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 75–80.
120. Taylor, D.R., Drazen, J.M., Herbison, G.P., Yandava, C.N., Hancox, R.J., Town, G.I. et al. Asthma exacerbations during long-term β -agonist use: influence of β 2-adrenoceptor polymorphism. *Thorax.* 2000; 55: 762–767.
121. Green, S.A., Cole, G., Jacinto, M., Innis, M., and Liggett, S.B. A polymorphism of the human β 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem.* 1993; 268: 23116–23121.
122. Tantisira, K.G., Small, K.M., Litoajua, A.A., Weiss, S.T., and Liggett, S.B. Molecular properties and pharmacogenetics of a polymorphism of adenylyl cyclase 9 in asthma: interaction between beta-agonist and corticosteroid pathways. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 1671–1677.
123. Chung LP, Waterer G, Thompson PJ. Pharmacogenetics of β 2 adrenergic receptor gene polymorphisms, long-acting β -agonists and asthma. *Clin Exp Allergy.* 2011; 41: 312–326.

124. Birbian N, Singh J, Jindal SK, Singla N. Association of $\beta(2)$ -adrenergic receptor polymorphisms with asthma in a North Indian population. *Lung*. 2012; 190: 497–504.
125. Karam RA, Sabbah NA, Zidan HE, Rahman HM. Association between genetic polymorphisms of beta2 adrenergic receptors and nocturnal asthma in Egyptian children. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013; 23: 262–266.
126. Petrovic-Stanojevic N, Topic A, Nikolic A, Stankovic M, Dopudja-Pantic V, Milenkovic B, et al. Polymorphisms of beta2-adrenergic receptor gene in serbian asthmatic adults: effects on response to Beta-agonists. *Mol Diagn Ther*. 2014; 18: 639–46.
127. Butte NF, Garza C, de Onis M. Evaluation of the feasibility of international growth standards for school-aged children and adolescents. *Journal of Nutrition* 2007; 137;153–7.
128. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, Murray JJ, Pendergraft TB. Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:59–65.
129. Liu AH, Zeiger R, Sorkness C, Mahr T, Ostrom N, Burgess S, Rosenzweig JC, Manjunath R. Development and cross-sectional validation of the Childhood Asthma Control Test. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:817–825.
130. Schatz M, Mosen DM, Kosinski M, et al. Validity of the Asthma Control Test completed at home. *Am J Manag Care* 2007; 13:661–667.
131. American Thoracic Society. Standardization of spirometry, 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152: 1107–36.
132. Sahi PK, Shastri S, Lodha R, Gupta N, Pandey RM, Kabra KS, Kabra M. ADRB2 polymorphism and salbutamol responsiveness in Northern Indian children with mild to moderate exacerbation of asthma. *Indian Pediatr*. 2016;53:211–215.
133. Rabe KF, Vermeire PA, Soriano JB, Maier WC. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study. *Eur Respir J* 2000 Nov;16(5):802–7.

134. Szeffler SJ. Advancing asthma care: the glass is only half full! *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:485–94.
135. Chung LP, Waterer G, Thompson PJ: Pharmacogenetics of β 2 adrenergic receptor gene polymorphisms, long-acting β -agonists and asthma. *Clin Exp Allergy* 2011, 41(3):312–326.
136. Xie H G, S tein C M, Kim R B, X iao Z S, H e N , Z hou H H, G ainer J V, Brown NJ, Haines JL, Wood AJ: Frequency of functionally important beta-2 adrenoceptor polymorphisms varies markedly among African-American, Caucasian and Chinese individuals. *Pharmacogenetics*. 1999, 9 (4): 511–516.
137. de Paiva AC, Marson FA, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. Asthma: Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene as risk factors. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2014; 10: 8.
138. Migita O, Noguchi E, Jian Z, Shibasaki M, Migita T, Ichikawa K, Matsui A, Arinami T: ADRB2 polymorphisms and asthma susceptibility: transmission disequilibrium test and meta-analysis. *Int Arch Allergy Immunol* 2004,134(2):150–157.
139. Lima JJ, Holbrook JT, Wang J, Sylvester JE, Blake KV, Blumenthal MN, Castro M, Hanania N, Wise R: The C523A beta2 adrenergic receptor polymorphism associates with markers of asthma severity in African Americans. *J Asthma* 2006, 43(3):185–191.
140. Bhatnagar P, Gupta S, Guleria R, Kukreti R: Beta2-Adrenergic receptor polymorphisms and asthma in the Nor th Indian population. *Pharmacogenomics* 2005, 6(7):713–719.
141. Hall IP, Blakey JD, Al Balushi KA, Wheatley A, Sayers I, Pembrey ME, Ring SM, McArdle WL, Strachan DP: Beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma from childhood to middle age in the British 1958 birth cohort: a genetic association study. *Lancet* 2006, 368(9537):771–779.
142. Yin KS, Zhang XL, Qiu YY: Association between β 2-adrenergic receptor genetic polymorphisms and nocturnal asthmatic patients of Chinese Han nationality. *Respiration* 2006, 73(4):464–467.

143. Fu WP, Zhao ZH, Zhong L, Sun C, Fang LZ, Liu L, Zhang JQ, Wang L, Shu JK, Wang XM, Dai LM: Relationship between polymorphisms in the 5' leader cistron, positions 16 and 27 of the adrenergic β 2 receptor gene and asthma in a Han population from southwest China. *Respirology* 2011,16(8):1221–1227
144. Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggett SB. Influence of β 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995; 13: 25–33.
145. Taylor, DR, Epton, MJ, Kennedy, MA et al, Bronchodilator response in relation to β 2-adrenoceptor haplotype in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:700–703.
146. Lipworth, BJ, Hall, IP, Tan, S et al, Effects of genetic polymorphism on ex vivo and in vivo function of the β 2-adrenoceptors in asthmatic patients. *Chest.* 1999;115:324–328.
147. Drysdale, CM, McGraw, DW, Stack, CB et al, Complex promoter and coding region β 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:10483–10488.
148. Israel, E, Chinchilli, VM, Ford, JG et al, Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet.* 2004;364:1505–1512.
149. Palmer, CAN, Lipworth, BJ, Lee, S et al, Arginine-16 β 2 adrenoceptor genotype predisposes to exacerbations in young asthmatics taking regular salmeterol. *Thorax.* 2006;61:940–944.
150. Carroll CL, Stoltz P, Schramm CM, Zucker AR. ADRB2 polymorphisms affect response to treatment in children with severe asthma exacerbations. *Chest.* 2009; 135: 1186–92.
151. Telleria, JJ, Blanco-Quiros, A, Muntion, S et al, Tachyphylaxis to β 2-agonists in Spanish asthmatic patients could be modulated by β 2-adrenoceptor gene polymorphisms. *Respir Med.* 2006;100:1072–1078.

152. Lee, DK, Currie, GP, Hall, IP et al, The arginine-16 β 2-adrenoceptor polymorphism predisposes to bronchoprotective subsensitivity in patients treated with formoterol and salmeterol. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;57:68–75.
153. Martinez, FD, Graves, PE, Baldini, M et al, Association between genetic polymorphisms of the β 2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest*. 1997;100:3184–3188.
154. Kotani, Y, Nishimura, Y, Maeda, H et al, β 2-adrenergic receptor polymorphisms affect airway responsiveness to salbutamol in asthmatics. *J Asthma*. 1999;36:583–590.
155. Lima, JJ, Thomason, DB, Mohamed, MH et al, Impact of genetic polymorphisms of the β 2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;65:519–525.
156. Salah K, Morsy S, Atta A. Effects of ADRB2 polymorphism on asthma severity and response to salbutamol on Egyptian children. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol*. 2012; 10: 81–6.
157. Green SA, Turki, J, Innis, M, Liggett SB. Aminoterminal polymorphisms of the human β 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 1994;33: 9414–9.
158. Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggett SB. Influence of beta 2- adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:25–33.
159. Santulli G, Iaccarino G. Pinpointing beta adrenergic receptor in ageing pathophysiology: victim or executioner? *Evidence from crime scenes. Immun Ageing*. 2013;10:10.
160. Connolly MJ, Crowley JJ, Charan NB, Nielson CP, Vestal RE. Impaired bronchodilator response to albuterol in healthy elderly men and women. *Chest*. 1995;108:401–406.

161. Turner, Steve et al. Childhood asthma exacerbations and the Arg16 β 2-receptor polymorphism: A meta-analysis stratified by treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016; 138:107–113.
162. Bleecker ER, Postma DS, Lawrance RM, Meyers DA, Ambrose HJ, Goldman M. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to long acting beta2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *Lancet* 2007;370: 2118–25.
163. Wechsler ME, Kunselman SJ, Chinchilli VM, Bleecker E, Boushey HA, Calhoun WJ, et al. National Heart, Lung and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network. Effect of beta2-adrenergic receptor polymorphism on response to long acting beta2 agonist in asthma (LARGE trial): a genotype-stratified, randomised, placebo-controlled, crossover trial. *Lancet* 2009;374:1754–64.
164. Tsai HJ, Shaikh N, Kho JY, Battle N, Naqvi M, Navarro D, et al. ADRB2 polymorphisms: Pharmacogenetic response to bronchodilator among African American asthmatics. *Hum Genet.* 2006;119:547–57.
165. Martin AC, Zhang G, Rueter K, Khoo SK, Bizzantino J, Hayden CM, et al. ADRB2 polymorphisms predict response to beta2-agonists in children with acute asthma. *J Asthma.* 2008;45:383–8.
166. Szczepankiewicz A, Breborowicz A, Sobkowiak P, Kramer L, Popiel A. Role of ADRB2 gene polymorphism in asthma and response to beta2-agonists in Polish children. *J Appl Genet.* 2009;50:275–81.
167. Fu WP, Zhao ZH, Zhong L, Sun C, Fang LZ, Liu L, et al. Relationship between polymorphisms in the 5' leader cistron, positions 16 & 27 of ADRB2 gene & asthma in a Han population from southwest China. *Respirology.* 2011;16:1221–7.
168. Isaza C, Sepúlveda-Arias JC, Agudelo BI, Arciniegas W, Henao J, Porras GL, et al. ADRB2 polymorphisms in asthmatic and non-asthmatic school children from Colombia and their relationship to treatment response. *Pediatric Pulmonol.* 2012; 47:848–55.

169. Scichilone N, Capnoetto C, Fagone E, Benfante A, Paternò A, Heffler E et al. The Arg/Arg polymorphism of the ADRB2 is associated with the severity of allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2016; 4: 1251–1252.
170. Carroll C, Sala AK, Zucker A, Schramm C. β 2-Adrenergic Receptor Haplotype Linked to Intubation and Mechanical Ventilation in Children with Asthma. *Journal of Asthma*. 2012; 49: 563–568.
171. Choudhry S, Ung N, Avila PC, Ziv E, Nazario S, Casal J. Pharmacogenetic differences in response to albuterol between Puerto Ricans and Mexicans with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 563–70.
172. Stacey M. Miller & Victor E. Ortega Pharmacogenetics and the Development of Personalized Approaches for Combination Therapy in Asthma *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013; 13: 443–452.
173. Lima J. Do genetic polymorphisms alter patient response to inhaled bronchodilators? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014; 10(9): 1231–40.
174. Ortega V, Hawkins G, Moore W, Hastie A, Ampleford E, Busse W et al. Effect of rare variants in ADRB2 on risk of severe exacerbations and symptom control during longacting β agonist treatment in a multiethnic asthma population: a genetic study. *Lancet Respir Med*. 2014;2(3):204–13.
175. Hall I. Should we use ADRB2 variation to stratify asthma treatment? *Lancet Respir Med*. 2014;2(3):169–71.
176. Ortega V, Meyers D, Bleecker E. Asthma pharmacogenetics and the development of genetic profiles for personalized medicine *Pharmgenomics Pers Med*. 2015; 8: 9–22.
177. Lipworth B. Adrenoceptor genotype and bronchoprotective Subsensitivity with long-acting b-agonists in asthma. *Am J Respir Crit Care* 2013;188(12):1386–87.
178. Ortega V, Meyers D. Pharmacogenetics: Implications of race and ethnicity on defining genetic profiles for personalized medicine. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(1): 16–26.

SKRAĆENICE

ACT – Asthma Control Test – Test o kontroli astme

AC – adenil ciklaza

ACh – acetilholin

ADRB – beta adrenergički receptor

ADRB2 – beta-2 adrenergički receptor

ANOVA – analiza varijanse

APC – antigen prezentujuće ćelije

Arg – arginin

AQLQ – upitnik o kvaliteti života sa astmom

ATS – Američko torakalno društvo

ATP – adenzin trifosfat

BHR – bronhijalna hiperreaktivnost

BMI – body mass index – indeks telesne mase

Bp – bazni par

cAMP – ciklični 3',5'-adenozin monofosfat

CI – interval poverenja

CNS – centralni nervni sistem

CPI – inhibitor miozin-lakog-lanca- fosfataze (MLCP)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

Eo – eozinofili

ERS – Evropsko respiratorno društvo

FENO – frakcija izdahnutog dušičnog oksida (eng. Fractional Exhaled Nitric Oxide)

FEV1 – forsirani ekspirijumski volumen u 1 sekundi

Gi – inhibitorna subjedinica G-proteina

GINA – Globalna inicijativa za astmu

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest

GM-CSF – Faktor rasta trombocita

Gln – glutamin

Glu – glutaminska kiselina

Gly – glicin

Gq – subjedinica G-proteina, aktivator fosfolipaze C

GRK – G protein receptor kinaza

Gs – stimulatorna subjedinica G-proteina

HVE – Hardy Weinberg equilibrium - Hardy Weinberg-ova ravnoteža

Ig – imunoglobulin

IL – intereleukin

ISAAC – Internacionalna studija o astmi i alergijama kod dece

ICS – inhalacijski kortikosteroidi

Ile – izoleucin

LABA – dugodelujući beta2-agonist

LABA+ICS – dugodelujući beta2-agonisti u fiksnoj kombinaciji sa ICS

LTRA – antagonist leukotrijenskog receptora

PCR – polymerase chain reaction - polimeraza lančana reakcija

PEF – vršni eksirijumski protok

PKA – protein kinaza A

PKC – protein kinaza C

PAF – faktor aktivacije trombocita

RNK -- ribonukleinska kiselina

RSV – respiratorni sincicijalni virus

SABA – kratkodelujući beta2-agonisti

sIgE – specifični imunoglobulin E

SNP – single-nucleid polymorphism - tačkasti polimorfizam

Thr – treonin

Th1 – pomoćnički T limociti 1

Th2 – pomoćnički T limociti 2

TGF- α – transformirajući faktor rasta α

TNF- α – faktornekroze tumora α

uIgE – ukupni imunoglobulin E

Biografija autora

Nevena Jovičić je rođena u Beogradu gde je završila osnovnu školu i Treću beogradsku gimnaziju. Završila je Medicinski fakultet u Beogradu 2001. godine. Obavezan lekarski staž obavila je u Kliničkom centru Srbije. Zaposlena u Domu zdravlja „Savski venac“ do 2008. godine, a od iste godine je zaposlena u Univerzitetnoj dečjoj klinici u Beogradu u Službi za pulmologiju i alergologiju, najpre na određeno vreme kao lekar na specijalizaciji, potom od 2011. godine na neodređeno vreme.

Specijalistički ispit iz pedijatrije položila je 2012. godine sa odličnim uspehom. Usmeni ispit iz uže specijalizacije iz pulmologije položila je 2018. godine i u toku je ocena završnog rada iz uže specijalizacije. Magistarski rad iz pulmologije pod nazivom „Parapneumonijski izlivi kod dece: učestalost, tok i uticaj socioekonomskih činilaca na njihovu pojavu“ uspešno je odbranila 21. juna 2010. godine pod mentorstvom prof. dr Branimira Nestorovića.

S ciljem da se naučno i stručno edukuje učestvovala je na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima, uključujući i studijske boravke u inostranstvu kao što je *Ospedale pediatrico Meyer* u Firenci u Italiji. Pohađala je i uspešno završila programe edukacije iz oblasti fleksibilne bronhoskopije u zemlji i inostranstvu. Član je Srpskog lekarskog društva i Evropskog respiratornog udruženja.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Nevena Jovičić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom :“POLIMORFIZMI U GENU ZA BETA-2
ADRENERGIČKI RECEPTOR KOD DECE SA ASTMOM U SRBIJI“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18.07.2018.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Nevena Jovičić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada "POLIMORFIZMI U GENU ZA BETA-2 ADRENERGIČKI RECEPTOR
KOD DECE SA ASTMOM U SRBIJI"

Mentor Prof. dr Branimir Nestorović

Potpisani Nevena Jovičić

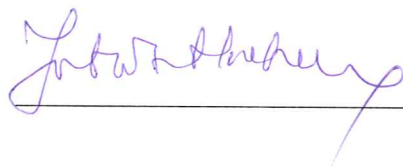
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 18.07.2018.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“POLIMORFIZMI U GENU ZA BETA-2 ADRENERGIČKI RECEPTOR KOD DECE SA ASTMOM U SRBIJI“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 18.07.2018.

Potpis doktoranda

